



DESARROLLO Y EXPRESIÓN GÉNICA EN CORMOS DE AZAFRÁN (*Crocus sativus* L.)

Manuel Alvarez Ortí

2003

UMI Number: 3139426



UMI Microform 3139426

Copyright 2003 by ProQuest Information and Learning Company.

All rights reserved. This microform edition is protected against
unauthorized copying under Title 17, United States Code.

ProQuest Information and Learning Company
300 North Zeeb Road
PO Box 1346
Ann Arbor, MI 48106-1346



DESARROLLO Y EXPRESIÓN GÉNICA EN CORMOS DE AZAFRÁN (*Crocus sativus* L.)

Memoria presentada por
MANUEL ALVAREZ ORTÍ
Para optar al grado de
DOCTOR INGENIERO AGRÓNOMO

Director
Dr JOSÉ ANTONIO FERNÁNDEZ PÉREZ

Abstract

Saffron is a traditional crop from the geographic area of La Mancha, known to be one of the most expensive spices of the world, and very appreciated for its colouring and flavouring characteristics and medical properties. It is a monocot, triploid, sterile plant that is vegetatively propagated by means of a subterranean organ specialized in the reserves accumulation, the corm. To help us to understand corm physiology and gene expression knowledge more deeply, six developmental stages were defined, including the complete development of this organ, from its appearance as latent buds, until its senescence and death. Gene expression was analysed in two of them, generating 650 partial sequences (ESTs) from two cDNA libraries. In the first one, constructed from corms collected in February, at a stage characterized by storage accumulation and enlargement (C3), a higher percentage of ESTs coding for proteins related to cell growth, protein metabolism, signal perception and transduction, defence against pathogens and stress, and carbohydrate metabolism was found. On the other hand, in the second library, constructed from corms collected in July, at a dormant stage (C4), a higher percentage of ESTs coding for proteins related to transport was found. In both libraries, a great percentage (36 % in C3 and 50 % in C4) did not show any significant similarity when compared to sequences present in public data bases, emphasizing the lack of knowledge about this organ. In addition, the major storage protein, a mannose-binding protein, was analysed. Its maximum expression occurs during summer months, when the corm is at a dormant stage. It is accumulated in the corm until flowering and disappears after it, in concordance to its storage role.

A mis padres...

Agradecimientos

En estas líneas quiero mostrar mi más sincero agradecimiento a toda la gente que ha colaborado, en mayor o menor medida, en la realización de este trabajo:

En primer lugar, a mi Director el Doctor José Antonio Fernández, cuyo asesoramiento, tanto científico como personal ha permitido mi formación en todos los aspectos.

Deseo mostrar un agradecimiento especial a la Doctora Lourdes Gómez, que contribuyó en la generación de la genoteca del estadio C4 y en la secuenciación de los clones procedentes de ésta, y cuyo asesoramiento científico ha sido fundamental para llevar a cabo este trabajo.

Al Doctor Julio Escribano y a Angela Rubio, que participaron en la realización de la genoteca del estadio C3 y en parte de los análisis de la lectina del cormo.

A Julia Pardo y Felicitas Jiménez, que colaboraron en la secuenciación de clones durante la realización de su Trabajo de Fin de Carrera, haciendo más llevadera la rutina.

A Silvia Blázquez, que proporcionó el material procedente del cultivo *in vitro* utilizados en el análisis del patrón de expresión de la lectina del cormo.

Al resto de compañeros que compartieron, en algún momento, las tareas diarias del laboratorio de la Sección de Biotecnología del Instituto de Desarrollo Regional de Albacete: Inmaculada Ríos, Elena Navarro, Concepción Rubio, Raquel Castillo, Sonia Jiménez, David Breijo y Ramón Alfaro.

A los Doctores Joaquín Medina, Antonio Molina y Abel Piqueras, cuyas visitas al laboratorio han contribuido a mi formación científica.

Y por supuesto, a mi familia, cuyo ánimo ha estado siempre presente durante la realización del trabajo.

Además, deseo mostrar mi agradecimiento a las instituciones que colaboraron en la financiación de parte de este trabajo: el Plan Nacional de I+D del Ministerio de Ciencia y Tecnología, mediante Proyectos Coordinados con Fondos FEDER (1FD97-1417-C02); el Ministerio de Educación y Cultura, dentro del Programa Sectorial de Promoción General del Conocimiento (PB98-0317); y la Consejería de Agricultura y Medio Ambiente de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha mediante su convenio con la Universidad de Castilla-La Mancha.

ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN	1
1.1.- EL AZAFRÁN	3
1.1.1.- Introducción	3
1.1.2.- Historia	4
1.1.3.- Situación actual: producción y variedades	7
El azafrán en el mundo	7
El azafrán en España	10
El azafrán en Castilla-La Mancha	12
Variedades	15
1.1.4.- Usos y costumbres	15
1.1.5.- Aspectos generales del cultivo	17
1.1.6.- Problemática del cultivo	20
1.1.7.- Descripción botánica	22
1.2.- EL CORMO	25
1.2.1.- El cormo como órgano reproductor	25
1.2.2.- Bioquímica del cormo	27
1.2.3.- Expresión génica en cormo	30
1.3.- OBJETIVOS	31
2.- MATERIAL Y MÉTODOS	33
2.1.- EXPRESIÓN DE GENES EN EL CORMO DE AZAFRÁN	35
2.1.1.- Material vegetal	35
2.1.2.- Construcción de las genotecas de ADNc	36
2.1.3.- Secuenciación	36
2.1.4.- Asignación a categorías funcionales y alineamientos	37
2.1.5.- Patrón de expresión	37

2.2- CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA DE RESERVA MAYORITARIA	38
2.2.1.- Material vegetal	38
2.2.2.- Extracción de proteínas y análisis de Western blot	38
2.2.3.- Purificación de ADN y ARN	39
2.2.4.- PCR y secuenciación	39
2.2.5.- Análisis de la secuencia	40
 3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	 43
 3.1.- DEFINICIÓN DE LOS ESTADÍOS DE DESARROLLO DEL CORMO DE AZAFRÁN	 45
 3.2.- EXPRESIÓN DE GENES EN EL CORMO DE AZAFRÁN	 49
3.2.1.- Secuenciación de ESTs	49
3.2.2.- Elementos transponibles	66
3.2.3.- Síntesis proteica, ensamblaje y degradación	68
3.2.4.- Transporte	77
3.2.5.- Organización celular	80
3.2.6.- Regulación génica y desarrollo	86
3.2.7.- Percepción y transducción de señales	91
3.2.8.- Respuesta a patógenos y estrés	94
3.2.9.- Metabolismo	103
3.2.10.- Función desconocida	107
3.2.11.- Resumen	108
3.2.12.- Patrón de expresión	110
 3.3.- CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA MAYORITARIA DE RESERVA	 113
3.3.1.- Análisis de la secuencia	113
3.3.2.- Análisis de expresión	120

4.- CONCLUSIONES	125
-------------------------	------------

5.- BIBLIOGRAFÍA	129
-------------------------	------------

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- EL AZAFRÁN, *Crocus sativus* L.

1.1.1.- Introducción

El cultivo del azafrán, *Crocus sativus* L. se ha venido realizando de forma tradicional en España, y más concretamente en La Mancha, alcanzando su auge con los árabes en el siglo VIII. La vinculación de este cultivo a la región castellano-manchega se pone de manifiesto por la existencia de festejos populares, como la Fiesta de la Rosa del Azafrán que se realiza en Consuegra (Toledo), los concursos de monda que se celebran en La Solana (Ciudad Real), o el Festival de la Rosa del Azafrán de Santa Ana (Albacete).

El azafrán es conocido principalmente por sus cualidades culinarias. Los estigmas secos y tostados constituyen probablemente la especia más cara del mundo, hasta tal punto que se le conoce como “oro rojo”. Su delicado aroma y poder colorante han hecho que sea ingrediente fundamental en la cocina de muchos países, principalmente mediterráneos, y que sea un producto muy apreciado por los grandes *gourmets* de todo el mundo.

C. sativus es una monocotiledónea, herbácea, perenne, que se reproduce únicamente de forma vegetativa a partir de un órgano de reserva subterráneo, el cormo. La delicadeza de sus flores y de sus estigmas, único órgano que se aprovecha de la planta, ha impedido la mecanización de este cultivo, que se sigue realizando de forma manual, principalmente la siembra y la recolección. Estas tareas son duras y laboriosas, lo cual ha provocado la reducción de las zonas de cultivo de azafrán en los países industrializados, en los que la mano de obra es cara. En España, el cultivo del azafrán se ha restringido a pequeñas explotaciones familiares, concebidas principalmente como una ayuda a la economía familiar, no constituyendo en ningún caso la fuente principal de ingresos.

1.1.2.- Historia

Desde épocas muy remotas, el azafrán ha sido una especia muy apreciada por sus cualidades aromatizantes, medicinales, colorantes y culinarias.

No se sabe a ciencia cierta dónde comenzó el cultivo y uso del azafrán. Su domesticación probablemente se originó a partir de un mutante de una especie cercana, *C. cartwrightianus*, seleccionado por la mayor longitud de los estigmas (Negbi, 1999), si bien existen controversias en cuanto al lugar concreto en que esto ocurrió (figura 1.1).

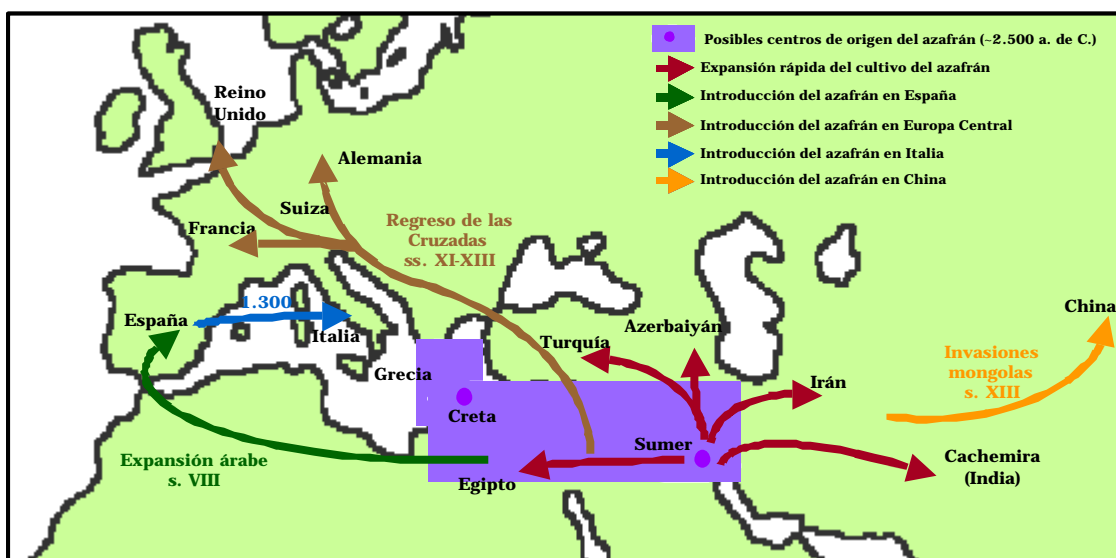


FIGURA 1.1.- Expansión del cultivo del azafrán desde su domesticación. En muchas de las zonas indicadas en el mapa el cultivo del azafrán se halla actualmente en declive o incluso ha desaparecido.

Existen ciertas evidencias de que esta domesticación se produjo en Creta, durante la Edad del Bronce tardía (alrededor del 2.500 a. de C.), en el apogeo de la cultura minoica. Excavaciones realizadas en Cnossos (Creta) han sacado a la luz frescos donde se representa al azafrán. Los minoicos fueron grandes comerciantes, como así lo demuestra la aparición de piezas de cerámica en lugares tan alejados como Egipto.

De esta forma pudieron dar a conocer el azafrán a las civilizaciones del área mediterránea.

Otras evidencias apuntan hacia un origen mesopotámico, pues los textos más antiguos sobre el azafrán corresponden a la civilización sumeria, establecida en la baja Mesopotamia (4.000 a. de C. a 2.000 a. de C.). Esta civilización, además de ser la primera en crear un sistema de escritura, también desarrolló sistemas de riego y practicó el comercio, lo que le permitió ponerse en contacto con los pueblos del Mediterráneo, del Caspio y del Indo. Así es como su cultivo pudo extenderse rápidamente por Oriente Medio, Asia y los países mediterráneos.

Pronto se describieron las propiedades medicinales del azafrán, ya que éstas se citan incluso en el papiro de Ebers (1.500 a. de C.), el papiro médico más importante del antiguo Egipto. El azafrán era usado en actos rituales y litúrgicos para realizar abluciones en los templos y lugares sagrados, e incluso por Cleopatra y otros faraones como esencia aromática y seductora.

El auge de la medicina en la cultura Helénica favoreció el uso del azafrán como planta medicinal. Grandes médicos como Hipócrates, Teofasto o Galeno le atribuyen propiedades medicinales y se usó como remedio para la conciliación del sueño, la atenuación de los efectos de los vinos, u otros usos lúdicos como en baños perfumados y afrodisíacos.

El azafrán también fue muy apreciado y usado en la cultura Romana, hasta el punto de que se utilizó para perfumar las calles de Roma para la entrada de Nerón. Ciertos autores han propuesto que la expansión romana pudo favorecer la expansión del cultivo del azafrán y su introducción en España, donde se daban las condiciones climáticas óptimas para su cultivo (Alonso y col., 1998). Sin embargo, este hecho no está claro, y lo que está fuera de duda es que alcanzó su auge en el siglo VIII, durante la ocupación árabe de la Península Ibérica. Fue un producto muy apreciado por la alta burguesía andalusí, y durante este

periodo se profundizó en sus propiedades medicinales. Concretamente en el mundo islámico se utilizó como anestésico y antiespasmódico.

Durante la Edad Media el cultivo del azafrán se extiende por toda Europa. Las Cruzadas (ss. XI-XIII), concebidas como expediciones militares con fines religiosos, contribuyeron a un enriquecimiento cultural de Europa al servir como contacto con las civilizaciones orientales. El regreso de los cruzados de Tierra Santa favoreció la expansión del cultivo del azafrán que se asentó en Suiza, Francia, etc. En Italia es introducido hacia el año 1.300 por un monje dominico a su vuelta de un viaje por España, adaptando las condiciones de cultivo a la región de los Abruzzos y otras como la Toscana o la isla de Cerdeña. El cultivo del azafrán incluso llega a Gran Bretaña a mediados del siglo XIV, en el que un peregrino llevó un bulbo oculto en su bastón. Este fue plantado en Walden, en el condado de Essex, y allí fue reproducido y utilizado para teñir tejidos de lana, alcanzando la zona gran prosperidad.

Hacia el Oriente, el cultivo del azafrán se mantuvo a través de diferentes civilizaciones por lo que actualmente es Irán, Azerbaiyán y Cachemira, e incluso es llevado a China por las invasiones mongolas de Gengis Kan (1.300).

El Renacimiento (ss. XV y XVI) marca la época dorada del azafrán en Europa, que se usa con fines medicinales, como colorante y especia. Venecia destaca como principal centro comercial del azafrán, que llega a alcanzar un precio mayor que su propio peso en oro. Este elevado precio provoca su adulteración para obtener un mayor rendimiento económico, aunque tal hecho pronto es duramente castigado, incluso con la muerte reflejando el gran aprecio que se confería al azafrán.

En la época actual, a pesar de que el azafrán sigue siendo la especia más cara del mundo, su cultivo se está abandonando prácticamente en toda Europa, debido a lo costoso de su recolección. En la actualidad, únicamente se cultiva con cierta importancia en España (La Mancha) y Grecia (Kozani), quedando más reducido en Francia, Italia y Suiza. Sin

embargo, los países asiáticos, principalmente Irán, continúan ampliando las zonas de cultivo, e incluso emigrantes de estos lugares están llevando el azafrán a regiones muy alejadas, como California. Asimismo su cultivo se ha extendido a otras regiones donde las condiciones climáticas lo permiten, como Australia (Tasmania), donde se cultiva desde 1.994, y Nueva Zelanda, donde, a pesar de que los primeros intentos ofrecieron una floración errática, en la zona de Otago Central, el azafrán ha crecido y florecido de forma consistente. También se intenta su adaptación en algunos países sudamericanos (Argentina, Chile).

1.1.3.- Situación actual: producción y variedades.

El azafrán en el mundo

En la actualidad, los datos de producción de azafrán están sujetos a grandes controversias, principalmente debido a que los principales productores son países con una tradicional política de aislamiento internacional, como la India o Irán, en los cuales no ha sido fácil obtener cifras fiables de producción y cultivo del azafrán. Sin embargo se está de acuerdo en que Irán ocupa la posición predominante actual dentro del mercado mundial del azafrán (figura 1.2). Según las estadísticas del Ministerio de Agricultura iraní, su producción en 1.999 fue de 173 tm (el 85 % del azafrán mundial), de las cuales, aproximadamente la mitad (88 tm) se destinaron a la exportación. Estas cifras han aumentado en el 2.000, año en el que Irán exportó 106,5 tm, siendo sus principales destinos los Emiratos Árabes Unidos y España.

Detrás de Irán se sitúan Grecia, con una producción que oscila entre 6 y 12 tm, España, que según fuentes del Ministerio de Agricultura presentó una producción en 1.999 cercana a las 5 tm, Marruecos y la India con alrededor de 2-3 tm, y finalmente Italia con una producción anual que apenas llega a los 100 kg, en un área de cultivo que no supera las 10 ha. Estos datos, si bien no son del todo fiables, si que marcan la tendencia de la producción mundial.

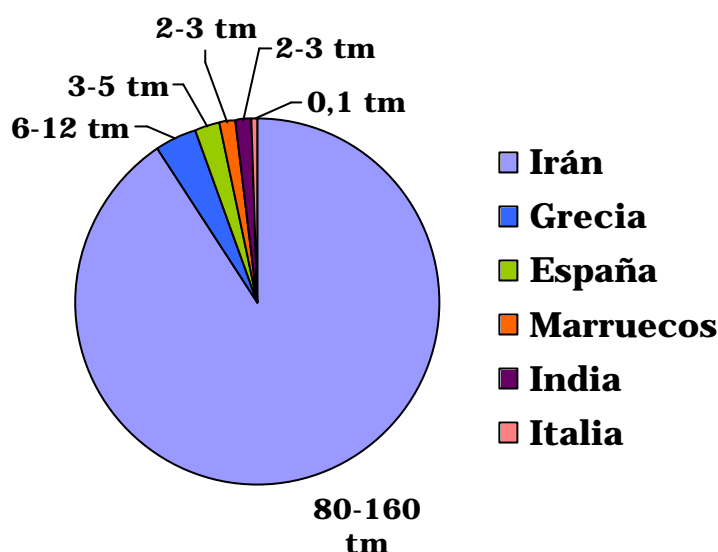


FIGURA 1.2.- Principales productores de azafrán mundial.

El azafrán en Irán se cultiva principalmente en las provincias del estado de Khorasan situado en la zona nor-oriental del país, donde se produce más del 90 % del azafrán persa, siendo la región de Ghaenat conocida por la calidad de su azafrán. Otras provincias con cultivos históricos, pero cuya producción se ha destinado principalmente al consumo interno, y por tanto, con menor peso en su exportación, son las de Fars y Kerman, al sureste del país. El peso específico del azafrán iraní en el mercado internacional se ha incrementado notablemente en la última década, pasando de 8 tm en el año 1.989 a las ya mencionadas 106,5 tm del año 2.000. Este enorme aumento se ha visto favorecido por las medidas tomadas por el gobierno iraní destinadas a facilitar las exportaciones, con lo cual se ha reducido el contrabando que se llevaba a cabo mediante la inclusión de azafrán en los equipajes de mano, principalmente destinado a los países de la zona y al mercado de los Emiratos Árabes. Este contrabando podía alcanzar cifras de entre 30 y 50 tm, si bien en la actualidad prácticamente ha desaparecido.

En el caso de la India, a pesar de contar con amplias zonas de cultivo y una gran producción en la región de Cachemira, la mayor parte de ésta se destina al consumo interno, por lo que en la actualidad no presenta una posición relevante en el mercado internacional. En la India se consumen grandes cantidades de azafrán, si bien prefieren el propio al importado de otras regiones del mundo. Por ello, el azafrán producido en la India es poco conocido a nivel mundial. Además, dificultades políticas han ocasionado su aislamiento en el mercado mundial del azafrán, por lo que sus cifras de producción son poco conocidas y no se representan con precisión en la figura 1.2.

En la figura 1.3 se recogen las principales zonas productoras de azafrán. En Europa, el cultivo está en regresión debido a lo costoso de su laboreo. Ha desaparecido ya de zonas como el Reino Unido o Alemania, donde se cultivó en la Edad Media. Se mantiene en Grecia gracias a una cooperativa que cuenta con 2.000 miembros de 40 villas pertenecientes a la prefectura de Kozani, en Macedonia. Gracias al esfuerzo realizado por esta cooperativa, Grecia parece haberse convertido en el segundo productor mundial de azafrán, estando incluido su producto dentro de las Denominaciones de Origen Protegidas de la Unión Europea. En España, el azafrán de la Mancha también cuenta con Denominación de Origen, pero el área de cultivo, y por lo tanto la producción de estigma seco tostado continúa reduciéndose. A pesar de ello, La Mancha sigue siendo uno de los principales lugares comercializadores de azafrán a nivel mundial.

Otros lugares de Europa donde el cultivo del azafrán se continúa realizando con menor importancia son Italia, en la región de los Abruzzos, donde el cultivo llegó a tener una gran importancia y que se ha ido perdiendo, reduciéndose de las 430 ha de principios de siglo a las menos de 10 ha que se cultivan en la actualidad y Francia, en la región de Quercy, en las estribaciones del Macizo Central. En Suiza, en la localidad de Mund, el cultivo del azafrán se realiza únicamente para preservar las tradiciones y la cultura que lo envuelven, ya que la

producción alcanzada es irrelevante, y se destina a los restaurantes de la zona y a la fabricación de un licor.



FIGURA 1.3.- Principales zonas de cultivo de azafrán en la actualidad.

Otros países importantes desde el punto de vista del cultivo del azafrán son Marruecos, donde se sigue cultivando en la región de Taliouine, entre las cordilleras del Alto Atlas y el Antiatlás, y en menor medida en Azerbaiyán, en la península de Apsheron, en las cercanías de su capital Bakú.

El azafrán en España

España ocupaba la posición predominante en el mercado mundial del azafrán a principios del siglo XX, con producciones de estigma seco tostado que superaban las 120 tm, con más de 12.000 ha de cultivo repartidas principalmente por las provincias manchegas (Albacete, Ciudad Real, Cuenca y Toledo), pero con cultivos importantes en las provincias de Teruel, Murcia, Valencia, Castellón, Zaragoza, etc. Sin

embargo, la laboriosidad de su cultivo, el abandono de las zonas rurales y la competencia con los países asiáticos en los que la mano de obra es más abundante, han ocasionado una disminución preocupante en sus áreas de cultivo. Según los datos de la Estadística Nacional Agraria, en 1.998 las zonas de cultivo de azafrán español más importantes se encontraban en la Mancha, con un total de 713 ha que produjeron 6.759 kg. Entre las provincias manchegas, Albacete era la región más productora (526 ha, 4.562 kg), seguida de Toledo (121 ha, 1.770 kg), Cuenca (51 ha, 316 kg) y Ciudad Real (15 ha, 111 kg). En Teruel se mantenían importantes zonas de cultivo, con 126 ha y 269 kg producidos, mientras que en Castellón y Santa Cruz de Tenerife quedaban cultivos residuales que no sobrepasaron las 5 ha. Sin embargo, el azafrán ya ha desaparecido de zonas donde éste se cultivaba tradicionalmente, como la Región de Murcia, y gran parte del Levante.

Estos datos de 1.998 se han reducido sensiblemente en el momento actual, teniendo en cuenta la tendencia del cultivo en la última década, en la que se sigue apreciando una caída continuada (figura 1.4).

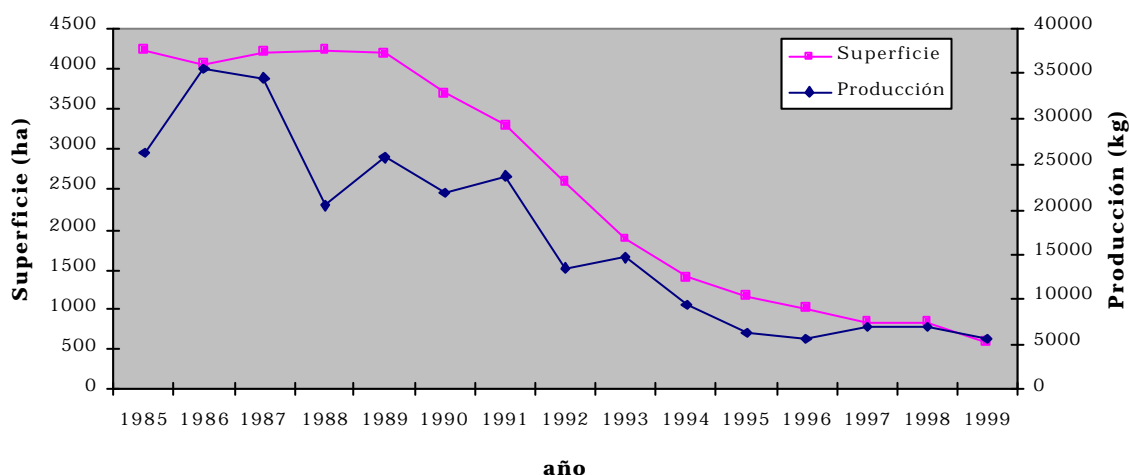


FIGURA 1.4.- Evolución de la superficie cultivada y de la producción de estigma seco tostado en España.

Fuente: Anuario M.A.P.A.

A pesar de la disminución de la producción de azafrán, España sigue manteniendo una posición privilegiada en el mercado mundial, debido a que son las empresas españolas las que dominan los canales de distribución de esta especia en los mercados principales: Estados Unidos y Oriente Medio. Esta supremacía se mantiene gracias a las importaciones de azafrán principalmente de origen iraní y su posterior exportación, bien solo o mezclado con el español.

El azafrán en Castilla-La Mancha

Sin ninguna duda, el azafrán más conocido y prestigioso a nivel mundial es el producido en la zona geográfica de La Mancha, que incluye parte de las provincias de Albacete, Ciudad Real, Cuenca y Toledo. Además, esta zona es la principal productora dentro del territorio español, pues en estas cuatro provincias se obtiene más de un 90 % del azafrán nacional.

Sin embargo, y a pesar del alto precio alcanzado por la especia en el mercado, el descenso, tanto en la superficie dedicada al cultivo de azafrán como en la producción de estigma seco tostado es acusado. El descenso se vienen produciendo desde comienzos del siglo XX, pero se hace más patente en la última década, como se puede apreciar en la figura 1.5, donde se refleja la evolución de estos dos parámetros en la Comunidad de Castilla-La Mancha y en sus cuatro provincias productoras desde 1.991 hasta 2.001.

En la comunidad de Castilla-La Mancha en el año 2.001 apenas se produjeron 2.746 kg, mientras que al comienzo de la década de los 90 esta cifra se acercaba a los 18.588 kg, lo cual significa una reducción del 85 % en apenas una década. En cuanto a la superficie cultivada, en esta década se ha bajado de 2.555 ha de 1.991 a las 244 ha del año 2.001, un descenso mayor del 90 %.

La provincia con una mayor producción tradicionalmente ha sido Albacete, con prácticamente un 70 % de la producción total de Castilla-La Mancha. Sin embargo, es la provincia en la que el descenso de

superficie y producción de azafrán es más acusado, hasta el punto de que en la actualidad se ha visto superada por la de Toledo. Es esta provincia la única que escapa al descenso de superficie y producción de azafrán, pues la tendencia en los últimos cinco años es creciente, si bien a niveles muy reducidos.

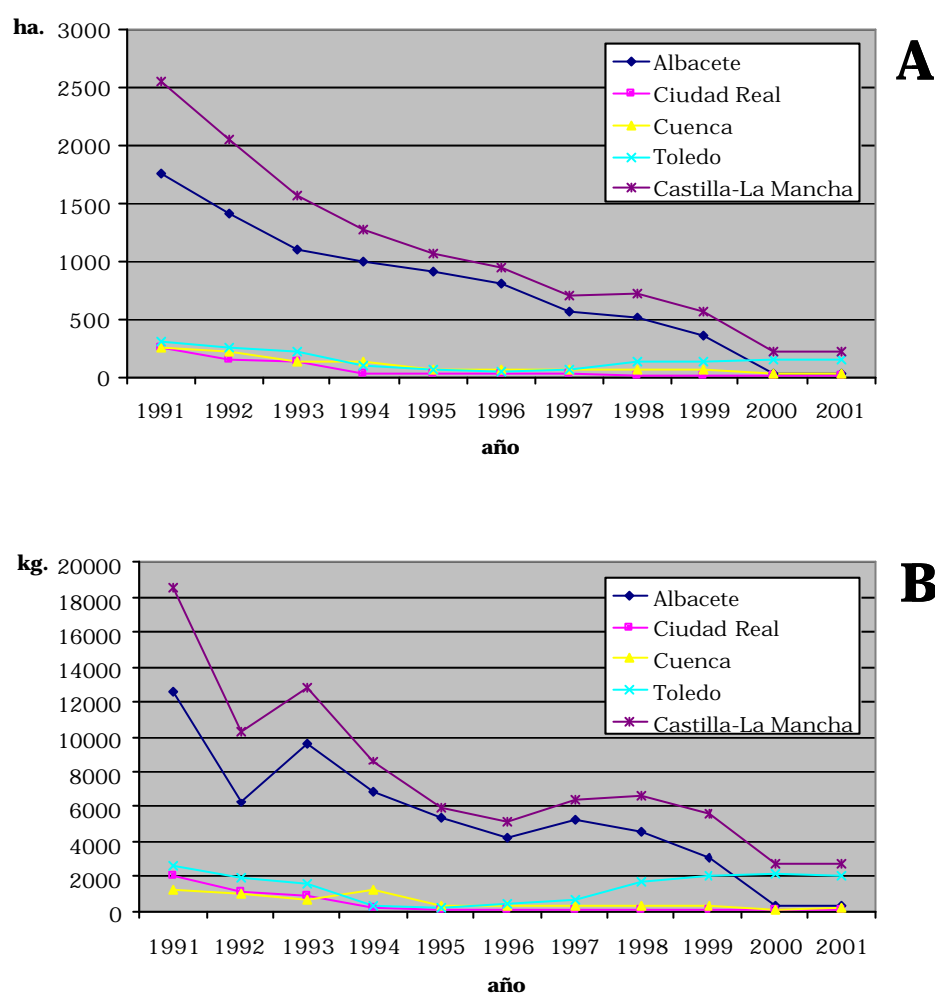


FIGURA 1.5.- A) Evolución de la superficie de cultivo del azafrán en Castilla-La Mancha. B) Evolución de la producción de estigma seco tostado en Castilla-La Mancha.

Fuente: Consejería de Agricultura de la JCCM
Datos de 1999, 2000 y 2001 provisionales.

La tendencia reflejada en la figura 1.5 indica que las perspectivas del cultivo del azafrán en Castilla-La Mancha no son esperanzadoras. Para tratar de frenar esta caída, se ha creado el Consejo Regulador de la Denominación de Origen Azafrán de la Mancha, inscrita en el Registro Comunitario de Denominaciones de Origen Protegidas desde el 7 de Marzo de 2001, Reglamento CE-464/2001. Este es el Organismo de Control que garantiza que el azafrán amparado por esta Denominación de Origen se ha producido dentro de su zona geográfica de acuerdo con unos requisitos establecidos en su Pliego de Condiciones, tratando de prestigiar y defender al azafrán de la Mancha por todo el mundo. La zona geográfica adscrita a la DO incluye a toda la provincia de Albacete y gran parte de las de Cuenca, Ciudad Real y Toledo (figura 1.6).

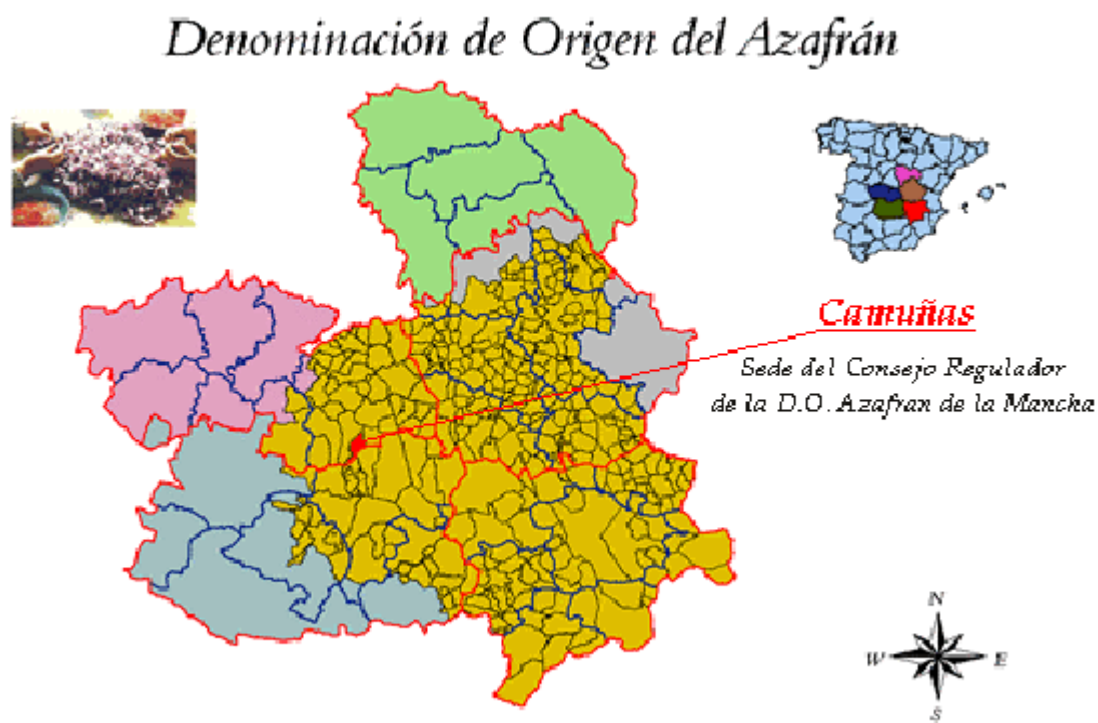


FIGURA 1.6.- Zona geográfica de producción adscrita a la Denominación de Origen Azafrán de La Mancha. (www.doazafrandelamancha.com)

Variedades

A pesar de que el azafrán es un autotriploide estéril que se reproduce únicamente de forma vegetativa a partir del cormo, es posible encontrar diferencias fenotípicas en las distintas regiones en las que se cultiva.

En la India, el azafrán presenta estigmas más largos y con la cabeza más gruesa, presentando un color rojo intenso. En Irán, los estigmas son más pequeños y delgados, mientras que el azafrán español, parece ser el más aromático, si bien este hecho puede ser debido a la manera de tostarlo.

En Italia, se presume de que su azafrán presenta estigmas más largos que en el resto del mundo debido a su modo de cultivo, en el que el azafrán es levantado y vuelto a sembrar cada año, por lo que está sometido a una selección constante.

1.1.4.- Usos y costumbres

El único órgano que se emplea de la planta del azafrán son sus estigmas, que una vez secos y tostados dan lugar a la especia más cara del mundo. Esta especia es usada tradicionalmente y forma parte de la cultura culinaria de una gran cantidad de países, principalmente del área mediterránea y Asia Menor, tales como España, Francia, Italia, Grecia, India, Irán, etc., donde es un elemento insustituible para dar color y aroma a sus platos más típicos. Concretamente, el mayor consumidor de azafrán es la India, donde es una distinción de honor hacia los invitados, por lo que la preparación de platos con azafrán se ha convertido en una norma, en lugar de ser una excepción. Pero su empleo en la cocina no se restringe a esta zona, extendiéndose incluso a países como Suecia, donde existe la tradición de felicitar a la familia y amigos ofreciéndoles un pastel de azafrán, o a Japón, donde su uso se está extendiendo cada vez más para dar color y realzar el sabor de su pescado crudo.

Pero el azafrán no solo se utiliza como condimento, sino que tiene otros interesantes usos en diferentes campos:

- **Medicina:** el azafrán presenta una gran cantidad de cualidades medicinales, entre las cuales se pueden destacar su carácter tónico (estimulante del apetito); eupéctico (favorece la digestión); sedante (combate la tos y la bronquitis, mitiga los cólicos y el insomnio, calma los problemas de dentición infantil); carminativo (favorece la expulsión de gases acumulados); emenagogo (favorece la menstruación), también es eficaz para combatir los trastornos nerviosos, espasmódicos y el asma. En la India, se usa en la medicina Ayurvédica, para tratar un gran número de males, desde la artritis hasta la impotencia o la infertilidad. Asimismo, es usado con distintos fines en las medicinas tradicionales de China y el Tibet.
- **Cosmética:** en los países asiáticos, el azafrán se empleaba entre la aristocracia para dar un tinte dorado a su piel. Esta coloración de piel era tan deseable que incluso las mujeres embarazadas bebían infusiones de azafrán en leche para que sus futuros hijos adquirieran ese tono dorado. En la actualidad, el uso cosmético del azafrán se está extendiendo, gracias a las tendencias de emplear productos naturales. Entre sus usos está la preparación de cremas bronceadoras. Asimismo, su fragancia lo hace indicado como ingrediente en la preparación de perfumes.
- **Colorantes:** gracias a su poder colorante, el azafrán se emplea para teñir telas, como las túnicas de los monjes budistas. Sin embargo, este uso no siempre ha estado bien considerado, pues incluso Enrique VIII de Inglaterra llegó a prohibir el uso del azafrán como tinte por considerarlo una manera de malgastar la carísima especia, que en aquellos tiempos alcanzaba un precio superior al del oro. Además de en tinciones de prendas textiles, el azafrán también puede ser usado en tinciones histológicas (Basker y Negbi, 1983).

- Investigación biomédica: el azafrán ha alcanzado un gran interés en la investigación biomédica en fechas recientes. Ello se debe a la tendencia a buscar productos naturales para tratamientos de diversas enfermedades y a que se ha observado que extractos de azafrán poseen propiedades anticancerígenas, antimutagénicas e inmunomoduladoras (Nair y col., 1991, 1995; Salomi y col., 1991; Abdullaev, 1993, 2002), inhibiendo la formación de colonias y la síntesis de ARN y ADN (Abdullaev y Frenkel, 1992; Abdullaev, 1994). En concreto, las crocinas y picrocrocinas, los carotenoides que dan color rojo al estigma, inhiben el crecimiento de diversas líneas celulares tumorales (Tarantilis y col., 1994; Escribano y col., 1996). Además se ha descrito que la crocina también tiene efectos positivos en el aprendizaje y la memoria, pudiendo ser útil para el tratamiento de desórdenes neurodegenerativos (Abe y Saito, 2000).
- Otros usos: el azafrán es usado para realzar el aroma de otros productos, como el tabaco de mascar en la India. Además, se incluye en la industria alimentaria, como ingrediente en comidas deshidratadas, sopas, helados, etc. También ha sido empleado con fines religiosos, principalmente en la India, donde incluso en la actualidad es considerado como signo de bendiciones y buena suerte, e incluso se sabe que ciertos textos sagrados se escribieron con tinta de azafrán. Además, el azafrán parece ser que presenta propiedades afrodisíacas, y es muy usado con este fin en Asia y en Oriente Medio.

1.1.5.- Aspectos generales del cultivo

Actualmente, el azafrán se cultiva por casi todo el mundo, en aquellos lugares que presenten un clima cálido, con inviernos fríos y suelos sueltos. No es raro contemplar los cultivos de azafrán bajo un manto de nieve en invierno, en lugares donde los cultivos se realizan a grandes altitudes como India o Suiza.

El cultivo del azafrán en España se realiza generalmente en ciclos de tres años. Estos valores pueden cambiar dependiendo de la zona geográfica y su cultura. Por ejemplo, en Italia, en la región de los Abruzzos, los cormos son replantados cada año, mientras que el caso opuesto lo presenta Irán, donde puede llegar a un intervalo de entre siete y nueve años.

En Pérez Bueno (1988) se repasan las principales características del cultivo del azafrán en España, que se resumen a continuación. Al terminar el ciclo, los cormos son levantados mediante una labor de vertedera y, después de una adecuada selección sanitaria y por tamaños, una parte de la producción de cormos es empleada en la nueva plantación. Esta labor se realiza durante el mes de mayo o primera quincena de junio, época en la cual las condiciones climáticas y del suelo son las óptimas. La plantación debe venir precedida de una labor que deje el suelo mullido y se realiza en surcos. La época de plantación varía en función de la localización de los cultivos. Así, en India, ésta se realiza en julio y agosto (Tocaven, 2003).

La floración en España acontece a finales de octubre y se prolonga durante una media de 20 días en las primeras semanas de noviembre, en lo que se conoce como “manto”, durante el cual, las tierras sembradas de azafrán adquieren un tono morado. La recolección de las flores se debe realizar inmediatamente a la nascencia de éstas, durante las primeras horas de la mañana. Es una labor costosa, realizada de forma manual, cortando las flores una a una por el sitio preciso, con cuidado de que no se desprendan o malogren los estigmas. Las flores han de ser recogidas cuando todavía están cerradas, a primeras horas de la mañana, pues las cualidades del azafrán disminuyen, entre otros factores, con la luz solar (Morimoto y col., 1994). Después de la recolección, ha de procederse a separar los estigmas de las flores, proceso denominado “monda”. Se ha descrito que el polen y estambres del azafrán presentan ciertos alérgenos que pueden causar asma o conjuntivitis a los trabajadores durante este periodo (Feo y col., 1997).

Posteriormente, los estigmas son sometidos a un tratamiento de tostado, colocados sobre cedazos, para que pierdan la humedad. Este tratamiento también varía según las zonas, pues en el resto de regiones azafraneras del mundo el azafrán se seca al sol o en habitaciones secas y cálidas. Los estigmas, una vez tostados o desecados, darán lugar a la tan apreciada especia.

La planta puede soportar temperaturas muy bajas durante el invierno y elevadas en el periodo estival. Sus necesidades de agua son mínimas, siendo necesario únicamente dos precipitaciones copiosas anuales, en los meses de marzo y septiembre por su influencia sobre la formación de tallos en el interior del cormo y la floración. En cuanto a suelos, prefiere terrenos ligeros, sueltos, que permitan una buena colonización radicular.

Es un cultivo que no requiere muchas labores. Éstas normalmente se reducen a la preparación del suelo previo a la plantación, la realización de entrecavas en otoño para mullir el terreno y binas en verano para mantener el terreno libre de malas hierbas. Asimismo, es aconsejable someter a los cormos a un tratamiento fungicida previo a su plantación, pues suelen estar sometidos al ataque de patógenos de suelo, principalmente hongos, que ocasionan graves pérdidas en la producción. Entre éstos se citan especies como *Rhizoctonia violacea*, *Phoma crocophila* o *Fusarium oxysporum* (Tocaven, 2003). En Italia se han documentado ataques que afectaron hasta al 50 % de los cormos por medio de *Penicillium corymbiferum* (Capelli y col., 1991), un patógeno de las especies de *Crocus* (Sutton y Wale, 1985).

El azafrán no presenta necesidades exigentes de abonado. Sin embargo, un estudio realizado en la provincia de Khorasan (Irán), puso de manifiesto que el elemento más importante a la hora de la floración, y por consiguiente del rendimiento de la cosecha, es el Nitrógeno. Su aplicación incrementaba los rendimientos en la floración, mientras que en los ensayos realizados añadiendo Fósforo y Potasio no se encontraron beneficios adicionales, mostrándose como más beneficioso

el abonado con urea (Behzad y col., 1992a, b). Además, en suelos pobres es conveniente la adición de materia orgánica para alcanzar mayores rendimientos. Ésta se puede realizar esparciendo estiércol de forma homogénea por la parcela, un mes antes a la plantación de los cormos el primer año y un mes antes de la floración en los sucesivos.

1.1.6.- Problemática del cultivo

A pesar del alto precio alcanzado en el mercado mundial, el cultivo del azafrán en España se ha reducido enormemente hasta fechas actuales, en las que incluso ha desaparecido de zonas de cultivo tradicionales, y cada vez es más complicado encontrar campos de cultivo dedicados a esta especia.

Las causas de esta disminución son principalmente las siguientes:

- Escasez de mano de obra. Este cultivo se ha mantenido como explotaciones familiares de pequeña superficie, que contribuían a la economía familiar. En la actualidad, la emigración de la población rural a las ciudades ha ocasionado la desaparición de muchos de estos cultivos. Esta falta de mano de obra la encarece, haciendo inviable la competencia con países en los que la mano de obra es mucho más barata, como es el caso de Irán.
- Falta de mecanización específica, principalmente para la recogida de la flor, muy frágil, que se sigue realizando de forma manual. En este aspecto se están realizando esfuerzos de investigación, aunque en la actualidad, las patentes registradas no presentan un rendimiento adecuado.
- Escaso rendimiento de la explotación, pues sólo se aprovechan los estigmas. Además, el proceso de secado y tostado reduce aún más el peso final del producto. Se necesita recoger cerca de 200.000 flores para producir un kilo de azafrán, siendo la producción media de los campos de azafrán españoles de entre 5 y 10 kg/ha. En este punto se están realizando esfuerzos en el

Instituto de Desarrollo Regional de Albacete para tratar de proporcionar otros usos a la planta del azafrán, o revalorizar los tradicionales, como los médicos (Fernández y Escribano, 2000).

- Competencia con otros países. El azafrán iraní presenta un precio mucho más barato que el español. Esto ocasiona grandes importaciones, que pueden acabar con la producción de azafrán nacional y ocasionar la pérdida de su identidad, por la falta de normativas que regulen suficientemente su calidad.
- Falta de material vegetal de calidad. A pesar de la selección realizada por el agricultor, principalmente atendiendo al tamaño del cormo, en la actualidad no hay material vegetal de confianza. Además, al ser el azafrán una planta estéril, no ha podido ser mejorado por los métodos tradicionales. En este aspecto se han realizando esfuerzos por conseguir cormos mediante cultivo *in vitro* (Plessner y col., 1990; Ahuja y col., 1994), y en el Instituto de Desarrollo Regional de Albacete existe una línea de trabajo de puesta a punto de técnicas de cultivo *in vitro* y transformación de callos y cormos de azafrán para la obtención de cormos selectos (Piqueras y col., 1999).

Además, debido al alto precio alcanzado por el azafrán en el mercado internacional, cada vez es más corriente la adulteración del producto. En este aspecto, el azafrán debe estar constituido únicamente por los estigmas de la especie *C. sativus*. Sin embargo, es posible encontrarlo mezclado con los estigmas de otras plantas de aspecto similar, como el cáñamo (*Cannabis* sp.) que presenta dos estigmas anaranjados, o el cártamo (*Carthamus tinctorius*), también conocido como azafrán bastardo y que presenta una sustancia colorante conocida como rojo alazor, u otras como la caléndula (*Calendula officinalis*), el ármica (*Arnica montana*) o la salicaria (*Lythrum salicaria*), cuya presencia sólo es posible detectar mediante un análisis minucioso de las hebras.

Todo ello hace que el cultivo de azafrán en España, considerado históricamente como el de mejor calidad mundial, presente una

tendencia a desaparecer, si no se realizan actuaciones tendentes a su mejora. Esta mejora debe pasar por actuar sobre los procesos de mecanización, que faciliten la tarea de la recolección; y, por supuesto, por la mejora genética del material vegetal. La esterilidad de la planta del azafrán es un inconveniente en este aspecto, pues hasta la fecha la única actuación posible ha sido la selección de los cormos, atendiendo a su tamaño y estado sanitario. Para aplicar técnicas de mejora genética clásica sería interesante la obtención de semillas mediante cruzamientos con especies cercanas, como *C. cartwrightianus*, o crear nuevas formas en las que se incremente el nivel de ploidía para evitar las barreras de la esterilidad. En cualquier caso, la mejora genética podría apoyarse en métodos biotecnológicos como la propagación *in vitro*, o la transformación genética para obtener un material con mejores condiciones en cuanto a producción, resistencia al ataque de patógenos u otros factores de calidad del producto.

1.1.7.- Descripción botánica

La planta del azafrán (figura 1.7) es un geófito, en el que las yemas perdurantes están protegidas bajo tierra. Los brotes aéreos, con hojas y flores, se forman cada año, gracias a las sustancias de reserva almacenadas en el cormo.



FIGURA 1.7.- Planta completa de azafrán en el momento de la floración. Las hojas aparecen en la planta una vez que han surgido las flores. El cormo es un órgano subterráneo de reserva, rodeado de túnicas fibrosas que lo protegen.

Las flores presentan un periantio de 6 piezas unidas en su base, de color violeta azuladas, con 3 anteras amarillas y 3 estigmas de color amarillo-rojizo o anaranjado, muy finos en su base y engrosados en el ápice (figura 1.8 A y B). Las hojas, que surgen de forma simultánea o posteriormente a las flores, son de color verde oscuro, lineares, erectas, con una banda blanca en su cara interna y una nervadura en la externa.

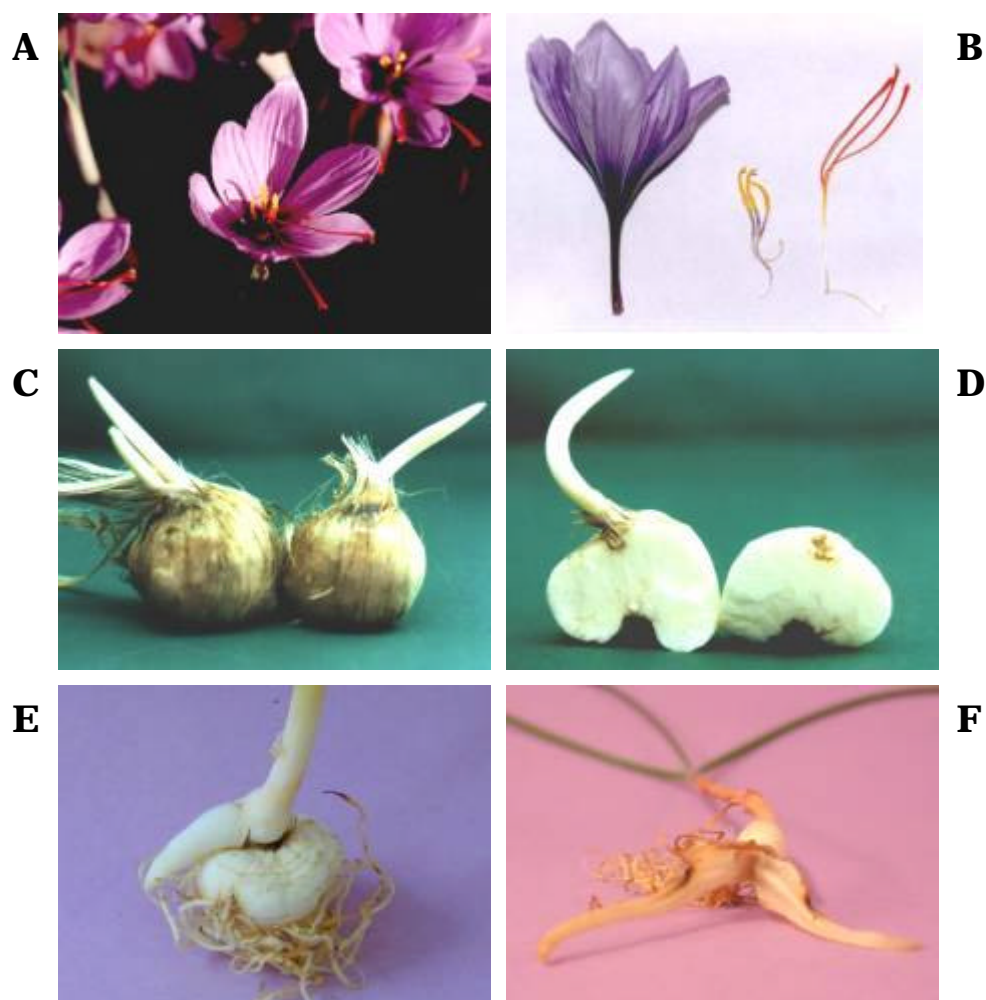


FIGURA 1.8.- A) Flor de azafrán. B) Disección de la flor del azafrán. El periantio está soldado en la base formando un tubo estrecho. Los 3 estigmas se unen en el estilo. C) Cormos de azafrán. D) Cormo seccionado. E) Detalle de una raíz contráctil. F) Sección de una raíz contráctil.

El cormo, órgano subterráneo de reserva, es carnoso, de color blanco y está protegido por una serie de túnicas fibrosas que le dan el aspecto de una “cebolla” (figura 1.8 C y D).

Las raíces emergen de la base del cormo y son delgadas y relativamente largas. En ciertas ocasiones, en la base de los brotes, surgen unas raíces mas gruesas y cortas que las raíces absorbentes, conocidas como raíces contráctiles (figura 1.8 E y F) y cuya función es anclar más profundamente a los nuevos cormos.

Taxonómicamente, el género *Crocus* se encuadra dentro de la familia de las Iridáceas. Es un género muy complejo, con más de 80 especies y distribución por el viejo mundo, principalmente en el Mediterráneo europeo y oeste de Asia. Atendiendo a sus características fisiológicas, su citología y la morfología de las túnicas del cormo, brácteas, bracteolas, hojas, flores y semillas, Mathew (1982, 1999) divide al género en una jerarquía de subgéneros, secciones y series. Entre éstas, *C. sativus* se incluye en la sección *Crocus*, serie *Crocus*, junto con otras especies con las túnicas del cormo finamente fibrosas, generalmente reticuladas, floración otoñal, hojas numerosas, entre 5 y 30, que aparecen de forma simultánea o inmediatamente posteriores a las flores, anteras amarillas, estilo con tres piezas generalmente rojas y expandidas en el ápice. Las especies de esta serie, su número cromosómico y distribución se reflejan en la tabla 1.1. Su distribución se reduce a la región del Mediterráneo oriental europeo (Italia, Grecia, Creta) y Oeste de Asia (desde Irán hasta Turquía). La única excepción es el azafrán, que no se encuentra en ningún lugar de forma natural, pero cuyo cultivo se ha extendido por muchas regiones.

TABLA 1.1.- Especies de la serie *Crocus*. Se indica su número cromosómico y su distribución geográfica.

Especie	nº crom.	Distribución
<i>C. cartwrightianus</i>	2n=16	Grecia, Creta
<i>C. sativus</i>	3n=24	---
<i>C. moabiticus</i>	2n=14	Jordania
<i>C. oreocreticus</i>	2n=16	Creta
<i>C. pallasii</i>	2n=12,14,16	Desde Balcanes hasta Irán
<i>C. thomasii</i>	2n=16	Italia, Dalmacia
<i>C. hadriaticus</i>	2n=16	Grecia
<i>C. asumaniae</i>	2n=26	Sur de Turquía
<i>C. mathewii</i>	2n=16	Sur de Turquía

1.2.- EL CORMO

1.2.1.- El cormo como órgano reproductor

El azafrán es una especie autotriploide, con un número de cromosomas $2n=3x=24$. Este hecho origina una meiosis irregular en la formación de gametos, que tiene como consecuencia un elevado porcentaje de polen y óvulos infértiles (Chichiriccò y Grilli Caiola, 1984; Chichiriccò, 1987, 1989; Grilli Caiola y Chichiriccò, 1991). El elevado porcentaje de infertilidad del polen, unida a la falta de germinación de éste en el estigma hacen que la especie sea estéril (Grilli Caiola, 1999). Por lo tanto, la única forma de reproducción de la planta del azafrán es de forma vegetativa, mediante la producción de cormos hijos. De esta forma se ha mantenido durante siglos, hasta tal punto que el azafrán en la actualidad representa una serie de clones en los que las diferencias de sus características bioquímicas y morfológicas son escasas. Estudios realizados mediante citometría de flujo con azafrán cultivado en Israel, Italia y España, han puesto de manifiesto que, tanto la cantidad total de ADN como su composición de bases es muy similar en ambas

localizaciones (Brandizzi y Grilli Caiola, 1996). Sin embargo faltan estudios más profundos de caracterización varietal que puedan poner de manifiesto las diferencias existentes entre el azafrán de sus diferentes orígenes.

El cormo es un órgano subterráneo, compuesto principalmente por tejido parenquimático, que acumula las sustancias de reserva necesarias para que pueda tener lugar la brotación después de superar las épocas desfavorables.

El desarrollo del cormo en La Mancha sigue la siguiente pauta (Botella y col., 2002): a finales de agosto o principios de septiembre, con las primeras lluvias otoñales, comienza la brotación de las yemas apicales que hasta ese momento han permanecido en estado latente en la superficie del cormo. Las hojas aparecen a finales de octubre o principios de noviembre, momento a partir del cual la base del tallo floral comenzará a engrosarse, acumulando sustancias de reserva en lo que será el nuevo cormo hijo. En abril, este nuevo cormo se encuentra ya completamente formado, mientras que el cormo materno, agotadas sus reservas, se encuentra totalmente senescente (figura 1.9).

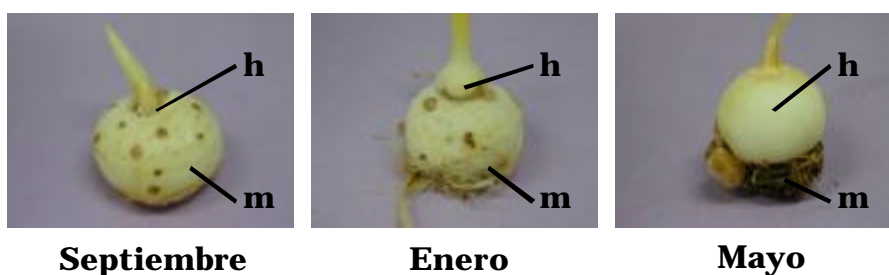


FIGURA 1.9.- Desarrollo del cormo de azafrán. h -Cormo hijo. m-Cormo materno

Por lo tanto, el cormo es el órgano reproductor del azafrán, mediante el cual se ha propagado durante milenios. Cada brote producirá un nuevo cormo hijo en la siguiente primavera. El número de brotes por cada cormo es un factor fundamental, pues además de afectar a la

producción de la especia, participará en la producción de cormos de la siguiente generación. Se han estudiado ciertos caracteres agronómicos que afectan al número de brotes, como el tamaño de los cormos (De Mastro y Ruta, 1993) o la profundidad de plantación (Negbi, 1990), pero no existen estudios más profundos que relacionen la producción, con otros caracteres bioquímicos o genéticos, sobre los cuales se pueda actuar para la mejora del material vegetal.

La importancia del cormo radica en su actividad reproductora. Es el único órgano presente en la planta durante los meses de verano, cuando las hojas se han marchitado (figura 1.10). Ello ocasiona que sea el órgano empleado como “semilla” por los agricultores. La reproducción de la planta del azafrán se realiza mediante mutiplicación vegetativa, que presenta la ventaja de que se mantienen las características genéticas de la planta, pero no permite la posibilidad de realizar la mejora genética clásica con técnicas tradicionales más allá de la simple selección masal.

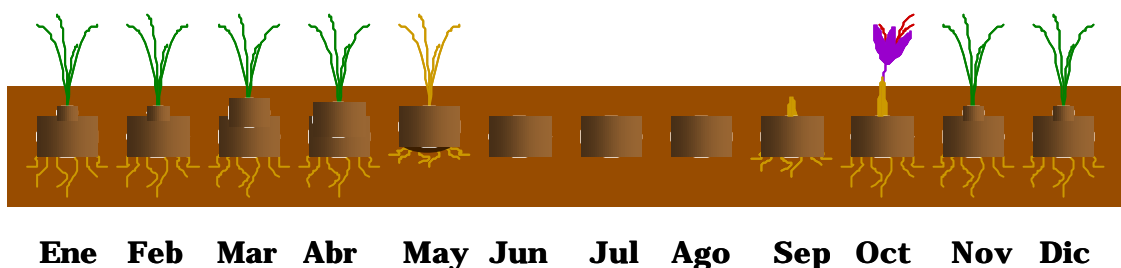


FIGURA 1.10.- Estado de la planta del azafrán a lo largo del año. La floración se produce durante unos pocos días de finales de octubre. Durante los meses de verano, el único órgano presente en la planta es el cormo, bajo la superficie del suelo.

2.2.- Bioquímica del cormo

La bioquímica del cormo es un aspecto poco conocido, pues apenas existen estudios centrados, tanto en los componentes del cormo como

en procesos tan cruciales como la acumulación de sustancias de reserva o la finalización de la dormancia.

Farooq y col. (1985) analizaron los constituyentes de la materia fresca del cormo, siendo los principales componentes los hidratos de carbono, que suponen alrededor de un 22 % de la materia fresca. Anteriormente, en un estudio realizado en Cachemira por Chrungoo y col. (1983), se había analizado la variación de ciertos carbohidratos presentes en el cormo de azafrán durante los periodos de dormancia y brotación. El principal carbohidrato de reserva es el almidón, que se acumula en el cormo de manera progresiva hasta superar la fase de dormancia, momento en el cual su concentración comienza a decrecer.

Además del almidón, mediante cromatografía cualitativa se observó que los carbohidratos más abundantes en el cormo son la sacarosa y la glucosa, con concentraciones menores de fructosa y trazas de rafinosa, maltosa y ribosa.

La sacarosa sigue un patrón contrario al almidón, pues se observó que su concentración se incrementaba al final de la dormancia, mientras que la glucosa se mantenía constante. Estos datos sugieren que el almidón actúa como almacén de carbohidratos hasta que comienza la iniciación y diferenciación de tejidos, momento en el cual su rotura permite la formación de un “pool” de sacarosa que puede ser movilizada hacia los tejidos en crecimiento (yemas en brotación y raíces). Este hecho se ve apoyado por la actividad de las giberelinas, que mediante la activación de enzimas hidrolíticas participa en la rotura de los polisacáridos para dar lugar a azúcares sencillos (Chrungoo y Farooq, 1989). En el cormo de azafrán, la actividad de las giberelinas no se aprecia hasta julio, y vuelve a desaparecer después, sugiriendo su participación en la hidrólisis del almidón.

Se ha encontrado que la aplicación de forma exógena de giberelinas (GA₃) a cormos durmientes estimula el crecimiento de yemas, promueve la floración e incluso incrementa el número de flores con lo que

aumenta el rendimiento (Azizbekova y col., 1978; Chrungoo y Farooq, 1984).

Otros compuestos estudiados en el cormo de azafrán son las poliaminas putrescina, espermidina y espermina (Jirage y col., 1994). Estos compuestos se han encontrado asociados a procesos de desarrollo y crecimiento en plantas superiores. Se han encontrado en concentraciones crecientes en tubérculos de patata durante la brotación (Kaur-Sawhney y col., 1982) y durante la germinación de semillas (Huang y Villanueva, 1992; Gallardo y col., 1992), la formación de tallos y raíces (Chriqui y col., 1986) y el desarrollo de frutas (Saftner y Baldi, 1990). En el cormo de azafrán, la putrescina únicamente se encontró en cormos durmientes, mientras que la espermidina y la espermina mostraron un máximo al inicio de la brotación. Se ha sugerido que la falta de putrescina en la brotación puede ser debida a su eficaz transformación en espermidina y espermina, conocidas por estar asociadas a estos procesos de crecimiento (Jirage y col., 1994). Los conjugados de estas tres poliaminas se encontraron en mayor proporción que en su estado libre, acumulándose progresivamente en los estadios donde el crecimiento es más profuso, y en una mayor proporción en los cormos florales que en los vegetativos.

Otros estudios sobre el cormo se han centrado en la caracterización de sus proteínas de reserva (Bezerra y col., 1995; Van Damme y col., 2000). En el cormo de azafrán se ha descrito una lectina de unión a manano como principal proteína de reserva (Oda y Tatsumi, 1993; Escribano y col., 2000). Este tipo de proteínas son sintetizadas por las plantas para que puedan servir como fuente de nitrógeno, azufre y carbono. Las proteínas de reserva se han estudiado más ampliamente en semillas (Josefsson y col., 1987; Goossens y col., 1994) donde son movilizadas para posibilitar el crecimiento de las plántulas. Sin embargo, las proteínas de reserva también se sintetizan durante el desarrollo de otros órganos de reserva, tales como tubérculos o rizomas (Hirai y col., 1993; Bezerra y col., 1995), donde aportan los aminoácidos

para que tenga lugar la brotación (Chrispeels y Raikhel, 1991; Conlan y col., 1995). Estas proteínas son sintetizadas en polirribosomas situados en la membrana del retículo endoplásmico, segregados al lumen mediante un péptido señal en su extremo amino-terminal, y allí glicosiladas y plegadas con la ayuda de chaperonas. Posteriormente son almacenadas en orgánulos especiales, derivados del retículo endoplásmico, denominados cuerpos proteicos (*protein bodies*, PB), que las protegen de una degradación prematura (Muntz, 1998). La importancia de las proteínas de reserva en la agricultura es obvia, pues éstas, almacenadas en las semillas u órganos vegetativos, son la mayor parte de las proteínas consumidas en la dieta, tanto humana como de los animales de granja. Además, su correcta síntesis y almacenamiento en los órganos vegetativos de la planta, puede favorecer la supervivencia en períodos de escasez de recursos, posibilitando la brotación al aparecer de nuevo la época de bonanza. Por ello, el estudio de los mecanismos fisiológicos y celulares de su biosíntesis presenta un gran interés, tanto a nivel práctico como académico. Su síntesis, transporte y almacenamiento se revisan en Herman y Larkins (1999).

Además, en el cormo de azafrán se han encontrado componentes proteicos de alto peso molecular, cuya función fisiológica en el cormo no se conoce, que actúan como activadores o inhibidores de la agregación plaquetaria (Liakopoulou-Kyriakides y col., 1985; Liakopoulou-Kyriakides y Skubas, 1990) y otros glicoconjugados citotóxicos e inmunoestimuladores (Escribano y col., 1999a, b, c, d), que además inhiben el crecimiento de raíces y células vegetales (Fernández y col., 2000) y que están siendo caracterizados en el Laboratorio de Biotecnología del Instituto de Desarrollo Regional de Albacete.

1.2.3.- Expresión génica en cormo

Los estudios centrados en la expresión de genes en el cormo durante su desarrollo, o durante ciertos procesos fisiológicos tales como la acumulación de sustancias de reserva o la dormancia son escasos y

puntuales. En este sentido, una manera rápida de establecer un inventario de genes expresados en un tejido y estadio de desarrollo específico es la secuenciación parcial de ADNc, lo que se conoce como ESTs (*Expressed Sequence Taggs*). Las secuencias se determinan a partir de uno o ambos extremos de clones de ADNc elegidos al azar, en una manera suficientemente precisa para identificar de forma no ambigua los genes correspondientes en la mayoría de los casos (Bouchez y Höfte, 1998). Esto se ha hecho con diferentes órganos en varios estadios de desarrollo en plantas como *Arabidopsis* (White y col., 2000), diversas especies de *Brassica* (Park y col., 1993; Lim y col., 2000), la leguminosa modelo *Lotus japonicus* (Asamizu y col., 2000a; Endo y col., 2000), frutas cítricas (Moriguchi y col., 1998), o la especie forestal *Cryptomeria japonica* (Ujino-Ihara, 2000), entre otros.

La colección de ESTs de tejidos metabólicamente activos, apoyándose en las nuevas tecnologías de los microchips de ADN, puede proveer estimaciones cuantitativas de niveles de expresión génica para desentrañar las redes reguladoras y metabólicas de plantas (Ohlrogge y Benning, 2000), como se ha hecho, por ejemplo, para estudiar la formación de xilema en pino (Allona y col., 1998), los tejidos formadores de madera de chopo (Sterky y col., 1998), la biosíntesis de lípidos (White y col., 2000) o la biosíntesis de la pared celular (Whetten y col., 2001). Además, mediante la comparación con las bases de datos públicas, se puede facilitar el descubrimiento de nuevos genes (Asamizu y col., 2000b), y pronto habrá información extensa acerca de los genes que responden a cambios en procesos del desarrollo como la germinación y la floración (Somerville y Somerville, 1999).

1.3.- OBJETIVOS

El presente trabajo forma parte de un proyecto más amplio que persigue la caracterización, el estudio del metabolismo y su regulación en el cormo de azafrán durante las distintas fases de su ciclo vital, como órgano reproductor de la planta. Constituye el primer estudio de

genómica en el azafrán, y en un órgano de reserva como es el cormo, lo cual aportará una gran cantidad de información que puede ser empleada en su mejora genética mediante herramientas biotecnológicas. El papel que juega la genómica en la mejora vegetal es vital, pues puede acelerar tremendamente el descubrimiento de genes con los que realizar transformaciones (Moya y González, 2000; Nuez y col., 2002).

Los objetivos planteados en este estudio son los siguientes:

1. Se definirán los estadios, atendiendo principalmente a los procesos fisiológicos que tienen lugar durante el desarrollo ontogénico del cormo de azafrán.
2. Secuenciación de ADNc obtenidos a partir de cormos en los estadios de desarrollo en los que predomina la acumulación de reservas y la dormancia. El análisis de las secuencias obtenidas permitirá la comparación con otras especies de las que haya datos disponibles, así como un primer paso en el establecimiento de relaciones filogenéticas con especies cercanas al azafrán.
3. Caracterización de la proteína mayoritaria de reserva, una lectina de unión a manano, para conocer su patrón de expresión y acumulación durante el desarrollo del cormo.

2.- MATERIAL Y MÉTODOS

2.1.- EXPRESIÓN DE GENES EN EL CORMO DE AZAFRÁN

2.1.1.- Material vegetal

Para la realización del estudio de expresión de genes, se recogieron cormos de azafrán de una pequeña parcela situada en Tarazona de la Mancha (Albacete), en los meses de febrero, durante el periodo de máximo engorde del cormo y julio, durante el estado de dormancia (figura 2.1). En el mes de febrero la planta presenta dos tipos de cormos, el materno y uno o varios cormos hijos que crecen en su superficie. Para este estudio se seleccionaron únicamente los cormos hijos, pues es en éstos donde se produce el crecimiento. Los cormos seleccionados en base a su estado sanitario, se congelaron inmediatamente a -80°C hasta el momento de su procesado.



FIGURA 2.1.- Aspecto de los cormos empleados en el estudio de expresión de genes. A) Cormo de febrero. B) Cormo de julio. El material empleado es el que indica la flecha.

2.1.2.- Construcción de las genotecas de ADNc

El ARN total se purificó mediante extracción con fenol-cloroformo, seguida de precipitación con LiCl (Sambrook y col., 1989; Sambrook y Russell, 2001) y el Poly(A+)ARN se purificó mediante cromatografía de afinidad usando columnas de oligo(dT) unido a celulosa (*Stratagene*, La Jolla, CA). La construcción de las genotecas se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante (*IZAP Express*, *Stratagene*, La Jolla, CA, EE.UU.).

La titulación de cada una de las genotecas en unidades formadoras de placas de lisis recombinantes fue de 1×10^6 . Después de una amplificación, muestras de cada una de las genotecas de ADNc se usaron para subclonar los insertos mediante escisión en masa para la obtención de plásmidos. Las genotecas de plásmidos resultantes se plaquearon a baja densidad en placas de agar Luria-Bertani con kanamicina (25 mg l^{-1}) y se seleccionaron clones aleatoriamente para su secuenciación.

2.1.3.- Secuenciación

El ADN plasmídico se purificó mediante lisis alcalina (Sambrook y Russell, 2001). La secuenciación del inserto se llevó a cabo usando el oligo T7 y terminadores de diclororrodamina (*DNA Sequencing Kit, dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* P/N 403402, *PE Biosystems*, Warrington, Inglaterra), en $10 \text{ }\mu\text{l}$ de reacción conteniendo $4 \text{ }\mu\text{l}$ del kit de secuenciación, $3,2 \text{ pmol}$ de oligo T7 y $0,5 \text{ }\mu\text{g}$ del ADN plasmídico. La reacción de secuenciación se llevó a cabo en 25 ciclos de $96 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 seg; $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 seg; $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 4 min, añadiendo un paso previo de desnaturalización de 3 min a $94 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Los productos de secuenciación se resolvieron mediante electroforesis capilar en un secuenciador automático ABIPRISM 310 (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EE.UU.). Los datos crudos obtenidos se editaron y comprobaron manualmente, mediante la comparación con

los electroferogramas, para eliminar picos fantasma y eliminar las secuencias del vector.

2.1.4.- Asignación a categorías funcionales y alineamientos

Las secuencias de nucleótidos y las seis posibles traducciones en aminoácidos de las secuencias parciales de ADNc se compararon con las bases de datos no redundantes del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov), utilizando los programas de comparación BLAST y BLASTX. Los resultados se consideraron significativos cuando el valor E fue menor de 10^{-5} .

Para realizar alineamientos y árboles filogenéticos de las secuencias con las que se encontró similitud se utilizó el programa ClustalX.

2.1.5.- Patrón de expresión

Para el análisis del patrón de expresión se seleccionaron 96 clones que mostraron similitud con secuencias de función conocida. El inserto se amplificó mediante PCR, en reacciones de 25 μ l, conteniendo 2,5 mM $MgCl_2$, 250 nM dNTPs, tampón de PCR 1X, 1 unidad de *Taq* polimerasa (*Promega*, Madison, WI, EE.UU.), 25 pmoles de los oligos T7 (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG) y SK (5'-TCT AGA ACT AGT GGA TC) y 50 ng de ADN plasmídico. Se realizaron 30 ciclos con las siguientes temperaturas: 94 °C, 1 minuto; 50 °C, 1 minuto; 72 °C, 1 minuto. Se añadió un primer paso de desnaturalización de 5 min, a 94 °C y un paso de extensión final de 10 min a 72 °C. Los resultados de la amplificación se comprobaron y cuantificaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2 %.

5 μ l de la reacción de amplificación se fijaron en membranas de nylon cargadas positivamente (*Boehringer Mannheim*, Mannheim, Alemania) mediante luz ultravioleta. Se incubaron con ADNc obtenido a partir de ARN de cormos de distintos estadios de desarrollo mediante el kit *Ready-To-Go™ You-Prime First-Strand Beads* de *Amersham Pharmacia*

Biotech Inc (Piscataway, NJ, EE.UU.) y marcado con digoxigenina (*Roche Diagnostics GmbH*, Mannheim, Alemania).

2.2.- CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA DE RESERVA MAYORITARIA

2.2.1.- Material vegetal

Para el estudio de expresión y acumulación de la proteína de reserva mayoritaria se recolectaron cormos a intervalos de alrededor de 15 días durante todo el año de la misma parcela, realizando la misma labor de congelación de forma inmediata a su recolección. Asimismo, en este estudio se contó con callos y microcormos obtenidos mediante cultivo *in vitro* en el laboratorio de Biotecnología del IDR de Albacete.

2.2.2.- Extracción de proteínas y análisis de Western blot

Se realizaron extractos proteicos de cada uno de los estadios de desarrollo del cormo. Para ello se pulverizó una muestra de alrededor de 500 mg de cormo con un mortero, evitando su descongelación con Nitrógeno líquido. Para extraer las proteínas se utilizó un tampón de extracción conteniendo 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM PMSF, 1mM β -mercaptoetanol. El sobrenadante se congeló a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior análisis.

Los extractos se cuantificaron mediante el método de Bradford (Ausubel y col., 1992) y se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) al 12,5 %. Las muestras se cargaron desnaturalizadas, calentando a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos y en presencia de β -mercaptoetanol. Para la realización del análisis mediante Western blot se transfirieron las proteínas a una membrana de PVDF de *Millipore Corporation* (Bedford, MA, EE.UU.) mediante electrotransferencia y se incubó con un anticuerpo policlonal para la

lectina obtenido en conejo (Escribano y col., 2000). El revelado se realizó mediante actividad fosfatasa alcalina (Sambrook y Russell, 2001).

2.2.3.- Purificación de ADN y ARN

El ADN genómico se obtuvo a partir de cormos y hojas de azafrán siguiendo el protocolo de Dellaporta y col. (1983).

Se purificó ARN total de todos los estadios de desarrollo del cormo de azafrán y de cada mes. Asimismo se extrajo ARN total de los diversos tejidos de la planta: raíz, hoja, pétalo, estigma y estambre, además de callo y cormo obtenidos mediante cultivo *in vitro*. Para ello se realizó una extracción con fenol-cloroformo, seguida de precipitación con LiCl (Sambrook y col., 1989; Sambrook y Russell, 2001).

A partir del ARN total, se sintetizó ADNc utilizando el kit *Ready-To-Go™ You-Prime First-Strand Beads* de *Amersham Pharmacia Biotech Inc* (Piscataway, NJ, EE.UU.) utilizando como cebador un oligo(dT).

2.2.4.- PCR y secuenciación

La amplificación del gen de la lectina se llevó a cabo en reacciones de 25 µl, conteniendo 2,5 mM MgCl₂, 250 nM dNTPs, tampón de PCR 1X, 1 unidad de *Taq* polimerasa (*Promega*, Madison, WI), 25 pmoles de cada oligo y 100 ng de ADN genómico. Se realizaron 30 ciclos con las siguientes temperaturas: 94 °C, 1 minuto; 60 °C, 1 minuto; 72 °C, 1 minuto. Se añadió un primer paso de desnaturalización de 5 min, a 94 °C y un paso de extensión final de 10 min a 72 °C. La amplificación se realizó con oligos diseñados a partir de una lectina similar de *Crocus vernus* (AF233283): Cslec5' y Cslec3' (figura 2.2).

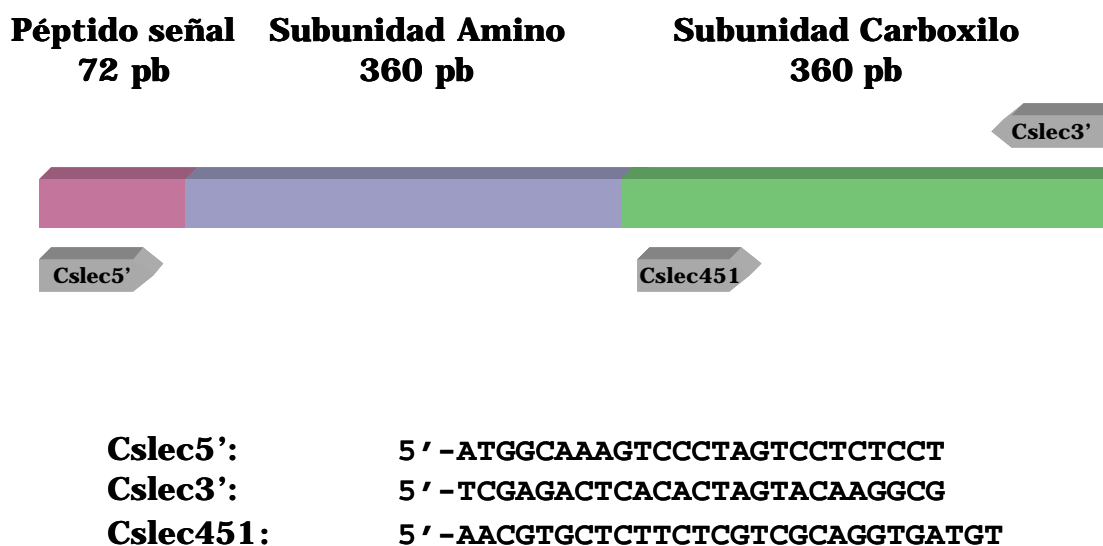


FIGURA 2.2.- Estrategia empleada para la amplificación y secuenciación del gen de la lectina y oligos utilizados.

Para comprobar el tamaño del fragmento resultante, se realizó una electroforesis de los productos de PCR en geles de agarosa al 2 %, conteniendo bromuro de etidio. El fragmento amplificado resultó del tamaño esperado, de alrededor de 850 pares de bases. La banda correspondiente al fragmento amplificado de la lectina se purificó del gel mediante columnas de purificación de ADN *UltraClean™ GelSpin* de *Mo Bio Laboratories* (Solana Beach, CA)

La secuencia de la parte codificante del gen de la lectina se obtuvo de manera similar a la expuesta en el apartado 2.1.3.

Para los ensayos de RT-PCR se siguió el mismo procedimiento utilizando como molde ADNc procedente de los cormos en los distintos estadios de desarrollo.

2.2.5.- Análisis de la secuencia

Para el análisis de la secuencia obtenida se emplearon herramientas informáticas disponibles en Internet. Para ello se recurrió a la página web del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*),

www.ncbi.nlm.nih.gov; la página del *Expasy Molecular Biology Server*, www.expasy.ch; y la página de *The Arabidopsis Information Resource* (TAIR), www.arabidopsis.org.

3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1.- DEFINICIÓN DE LOS ESTADÍOS DE DESARROLLO DEL CORMO DE AZAFRÁN

Se han definido seis estadios en el desarrollo del cormo de azafrán (figura 3.1), atendiendo a los procesos morfológicos y fisiológicos que tienen lugar en él, con relativa concordancia a los definidos por de Castro y col. (1992) para el cormo de taro (*Colocasia esculenta*). Los seis estadios de desarrollo del cormo son los siguientes:

C1.- Los cormos se presentan como yemas en estado latente, recubiertas por hojas similares a escamas, en la superficie de cormos maternos. Este estadio se puede considerar que se encuentra presente durante todo el año, pues además de las yemas apicales que dan lugar a los brotes florales, nos encontramos con yemas laterales que permanecen en estado latente.

C2.- Este estadio comienza con la brotación de la yema y finaliza cuando termina la floración. Por lo tanto, corresponde con el periodo “reproductivo” de la planta, caracterizado por una elevada actividad de proliferación celular y formación de nuevos tejidos.

C3.- En los cormos en este estadio comienza la acumulación de reservas y el consiguiente engrosamiento. En los cormos se han desarrollado hojas que persistirán hasta la primavera siguiente, siendo en este estadio cuando se realiza la fotosíntesis, acompañada de la acumulación de carbohidratos. Durante este estadio, el cormo sigue unido al cormo materno

C4.- El cormo en estadio C4 prolifera independientemente del materno, que se encuentra en estado senescente. Durante este estadio, las hojas se han secado y el cormo se prepara para superar las épocas desfavorables, reduciendo su actividad metabólica y entrando en una fase de dormancia.

C5.- En este estadio el cormo se puede considerar como un órgano almacén a partir del cual se surten los cormos en crecimiento que se desarrollan en su superficie.

C6.- El último estadio de desarrollo del cormo y representa su etapa final, en el cual se encuentra en estado senescente.

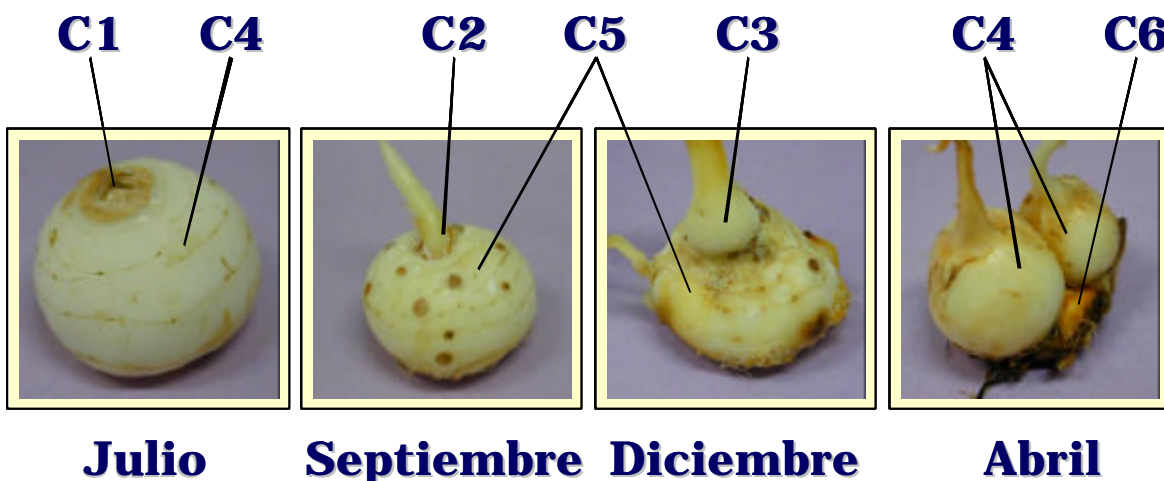


FIGURA 3.1.- Estadios de desarrollo del cormo de azafrán. Se muestran los cormos desprovistos de sus túnicas externas, para su mejor visualización. Los cormos se recogieron del campo en los meses indicados. En el cormo en estadio C1 se pueden observar las hojas similares a escamas que recubren a la yema apical. El estadio C2 lo conforman los tejidos de la base del brote, donde se va a formar el nuevo cormo. El estadio C3 se caracteriza porque se produce el engorde. El cormo en estadio C4 prolifera de forma independiente al cormo materno, mientras que en el estado C5 sustenta el crecimiento de cormos hijos en su superficie. El cormo en estadio C6 del mes de abril se muestra en estado senescente.

Estos seis estadios abarcan el desarrollo completo del cormo, que dura un poco más de dos años (figura 3.2). La brotación (estadio C2) comienza a finales de agosto o comienzos de septiembre, produciéndose la floración inmediatamente después, a finales de octubre. La floración apenas dura unos días y al acabar, con la aparición de las hojas, comienza el engrosamiento del cormo hijo en la base del tallo floral (estadio C3). Este engrosamiento prosigue hasta finales de marzo, momento en el cual el cormo hijo adquiere su tamaño definitivo, independizándose del cormo materno (estadio C4). El cormo en estadio C4 supera las condiciones desfavorables estivales, hasta la brotación de las yemas de su superficie en agosto del segundo año, momento en el

cual avanza al estadio C5. A partir de este momento el cormo materno nutre a los cormos hijos que proliferan en su superficie hasta que se produce su senescencia (C6) en el mes de abril.

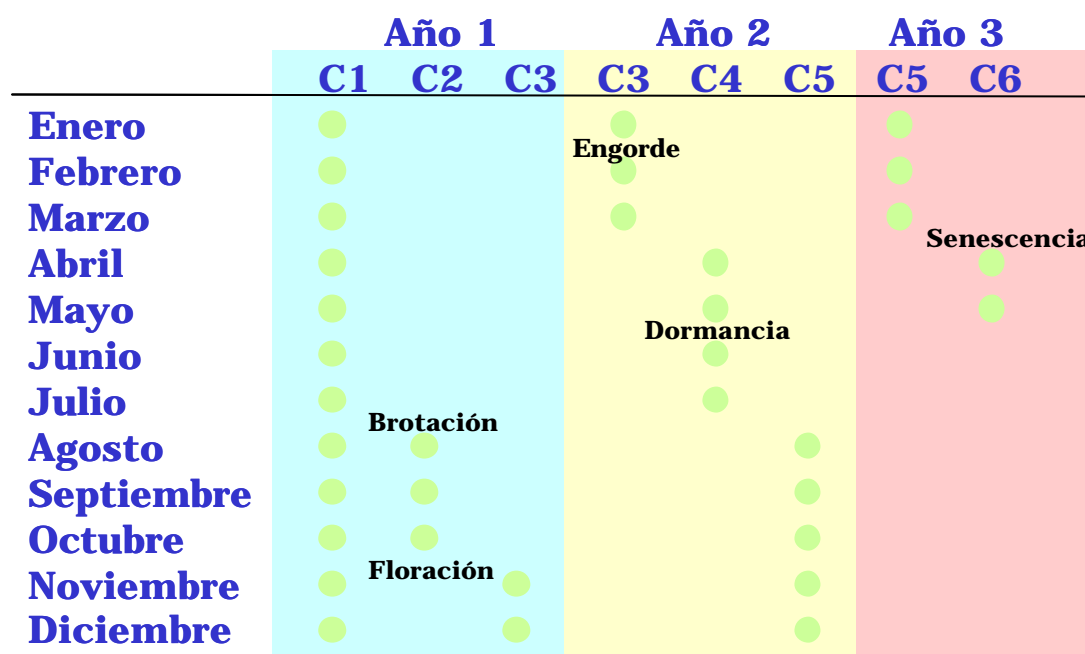


FIGURA 3.2.- Esquema del desarrollo del cormo a lo largo del tiempo. La brotación acontece a finales de agosto (comienzo de C2). El azafrán florece a finales de octubre (final de C2). Una vez terminada la floración comienza el engorde del cormo hijo (C3), que finaliza en abril, siendo ya el cormo hijo independiente (C4). En este estadio el azafrán supera los meses de verano, entrando en una fase de dormancia que finaliza con la nueva brotación de los cormos hijos (comienzo de C5). En el mes de abril el cormo en estadio C5 entra en una fase de senescencia y muerte.

Otros autores han propuesto diferentes estadios de desarrollo del cormo de azafrán, con el objeto de estudiar la acumulación de compuestos concretos durante ciertos procesos fisiológicos. Chrungoo y col. (1983) definieron 5 diferentes estadios de desarrollo entre el estado quiescente de las yemas y la antesis floral. Jirage y col. (1994), ampliaron este número de estadios a 6, englobando la dormancia del cormo y cinco diferentes estadios de brotación y crecimiento. Sin embargo, en ninguno de estos casos se abarca el desarrollo completo del cormo.

En nuestro caso, los seis estadios del cormo corresponden a diferentes procesos ontogénicos y fisiológicos que suceden durante su desarrollo:

C1.- Estado latente de las yemas

C2.- Elevada actividad metabólica con crecimiento de tejidos (brotación y floración)

C3.- Acumulación de sustancias de reserva y engrosamiento del cormo

C4.- Dormancia

C5.- Mantenimiento del crecimiento de cormos hijos

C6.- Senescencia

Con la definición de estos estadios se posibilita el posterior estudio de expresión de genes, diferenciando procesos tales como la acumulación de reservas, la dormancia o la brotación.

En el caso de los estadios C1 y C2, no se trata de cormos *sensu stricto* desde el punto de vista morfológico. Sin embargo, son los tejidos meristemáticos a partir de los cuales se van a formar los futuros cormos maduros, por lo que se han incluido dentro del desarrollo de este órgano como sus fases tempranas, de forma análoga a de Castro y col. (1992) para el cormo de taro (*Colocasia esculenta*).

3.2.- EXPRESIÓN DE GENES EN EL CORMO DE AZAFRÁN

3.2.1.- Secuenciación de ESTs

Para el estudio de expresión de genes en el cormo de azafrán, se seleccionaron cormos en estadio C3, recogidos en el periodo de mayor engrosamiento (febrero), y en estadio C4, durmientes (julio). Se obtuvieron secuencias parciales del extremo 3' (ESTs) de 449 clones procedentes de la librería de ADNc del estadio C3 y 201 clones de la librería del estadio C4, seleccionados al azar, con una longitud media de las secuencias de 407 y 342 pb respectivamente. El análisis de las secuencias reveló la existencia de 351 secuencias diferentes de la librería de C3 y 191 de la librería de C4, que se depositaron en la base de datos dbEST del *National Center for Biotechnology Information* (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Una vez analizadas las similitudes encontradas en las bases de datos públicas, las ESTs se agruparon en 10 categorías funcionales, de forma similar a las categorías establecidas por *The Arabidopsis Genome Initiative* (2000) en la publicación del genoma de *Arabidopsis*:

- 1.- Elementos transponibles: en esta categoría se incluyeron las secuencias que mostraron similitud con elementos móviles del genoma como retrotransposones y secuencias relacionadas con ellos y con retrovirus, así como secuencias relacionadas con transposones.
- 2.- Síntesis proteica, plegado y degradación: secuencias con similitud con proteínas participantes en metabolismo proteico, incluyendo su síntesis, entre las que se incluyeron las proteínas ribosómicas y factores de iniciación y elongación de la traducción; el plegado en el que tienen especial importancia las chaperonas moleculares, el direccionamiento y la degradación por medio de proteasas.
- 3.- Transporte: secuencias con similitud con proteínas implicadas en transporte a través de membranas o transporte intracelular de moléculas o vesículas.

4.- Desarrollo y regulación génica: secuencias con similitud con factores de transcripción y otras proteínas participantes en procesos de activación de la expresión de genes implicados en procesos del desarrollo celular o tisular.

5.- Organización celular: secuencias con similitud con proteínas implicadas en el mantenimiento y modificación de las estructuras celulares, principalmente la pared celular y el citoesqueleto.

6.- Percepción y transducción de señales: secuencias con similitud con proteínas implicadas en procesos de señalización, bien mediante su unión a calcio o bien mediante su actividad quinasa, así como los reguladores de éstas. También se han incluido en esta categoría secuencias con similitud con receptores.

7.- Respuesta a patógenos y estrés: secuencias con similitud con proteínas implicadas en procesos de defensa frente a patógenos, tales como las proteínas relacionadas con patogénesis, y proteínas implicadas en procesos de respuesta a estrés abiótico, estrés oxidativo o detoxificación.

8.- Metabolismo: secuencias con similitud con proteínas implicadas en vías metabólicas de degradación o síntesis de metabolitos.

9.- Otras: secuencias que mostraron similitud con elementos que no se pudieron incluir en las categorías anteriores.

10.- Desconocidas: secuencias con similitud con proteínas desconocidas o putativas y secuencias para las cuales no se encontró similitud en las bases de datos.

La identificación putativa de todos los clones secuenciados, en función de las similitudes halladas en las bases de datos, se muestra en la tabla 3.1, en la que los clones se encuentran ordenados en las diferentes categorías funcionales.

Las secuencias asignadas a cada categoría y el porcentaje que representan sobre el total de clones secuenciados se muestran en la tabla 3.2 y en la figura 3.3.

Tabla 3.1.- Identificación putativa de los ESTs de cormo de azafrán. n: número de clones; Id EST: identificación de la secuencia; GenBank accn: número de acceso en la base de datos dBEST del GenBank; Identificación putativa: identificación de la secuencia con la que mostraron mayor similitud.

n	Id EST	GenBank accn	Identificación putativa
C3			
Elementos transponibles			
1	CsaC30062	BM005527	Transcriptasa reversa de retrotransposón tipo <i>Ty-copia</i> (<i>Crocus vernus</i>)
1	CsaC30488	BM005538	Poliproteína tipo <i>copia</i> (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
1	CsaC30202	BM005533	Transcriptasa reversa de retroelemento sin LTR (<i>Oryza sativa</i>)
1	CsaC30409	BM005537	Homólogo de transcriptasa reversa (<i>A. thaliana</i>)
1	CsaC30066	BM005528	Retroelemento putativo (<i>O. sativa</i>)
1	CsaC30270	BM005534	Retroelemento putativo (<i>O. sativa</i>)
3	CsaC30122	BM005530	Poliproteína relacionada con retrovirus de transposón TNT 1-94
1	CsaC30098	BM005529	Probable poliproteína (piña)
1	CsaC30297	BM005535	Poliproteína putativa (<i>A. thaliana</i>)
1	CsaC30173	BM005531	Proteína gag-pol (<i>O. sativa</i>)
1	CsaC30049	BM005526	Precursor de proteína gag-pol (<i>O. sativa</i>)
1	CsaC30360	BM005536	Proteína gag (<i>Zea mays</i>)
1	CsaC30187	BM005532	Proteína de transposón putativa (<i>A. thaliana</i>)
Síntesis proteica, plegado y degradación			
1	CsaC30316	BM005552	Proteína ribosómica S1 putativa (<i>A. thaliana</i>)
3	CsaC30505	BM005564	Proteína ribosómica S3A
1	CsaC30215	BM005546	Proteína ribosómica S11 (<i>Z. mays</i>)
2	CsaC30294	BM005549	Similar a proteína ribosómica S13 (<i>A. thaliana</i>)
2	CsaC30141	BM005541	Proteína ribosómica S14
4	CsaC30434	BM005559	Proteína ribosómica S15A putativa (<i>A. thaliana</i>)
1	CsaC30559	BM005566	Proteína ribosómica S19
1	CsaC30189	BM005544	Proteína ribosómica S25 (<i>A. thaliana</i>)
1	CsaC30549	BM005565	Proteína ribosómica S27 (<i>A. thaliana</i>)
1	CsaC30469	BM005562	Proteína ribosómica S29 (<i>A. thaliana</i>)
1	CsaC30428	BM005558	Probable proteína ribosómica S30
1	CsaC30442	BM005560	Proteína ribosómica L3 (<i>O. sativa</i>)
1	CsaC30343	BM005554	Proteína ribosómica L10A putativa (<i>A. thaliana</i>)
1	CsaC30365	BM005555	Proteína ribosómica L10 (<i>Vitis riparia</i>)
1	CsaC30126	BM005540	Proteína ribosómica L15 (<i>Homo sapiens</i>)
1	CsaC30311	BM005551	Proteína ribosómica L17 (<i>O. sativa</i>)
1	CsaC30367	BM005556	Proteína ribosómica L17 (<i>Lycopersicon esculentum</i>)
1	CsaC30496	BM005563	Proteína ribosómica L17-2 (<i>O. sativa</i>)
2	CsaC30290	BM005548	Proteína ribosómica L21 (<i>O. sativa</i>)
2	CsaC30456	BM005561	Proteína ribosómica L27A (<i>Petunia x hybrida</i>)
1	CsaC30320	BM005553	Proteína ribosómica L31 (<i>Nicotiana glutinosa</i>)
1	CsaC30218	BM005547	Proteína ribosómica L33 (<i>Castanea sativa</i>)
1	CsaC30194	BM005545	Similar a proteína ribosómica (<i>Hordeum vulgare</i>)
5	CsaC30356	CB250219	Factor de iniciación de la traducción eIF1 (<i>Porteresia coarctata</i>)
1	CsaC30010	BM005539	Subunidad α de factor de elongación 1 (<i>Malus domestica</i>)
1	CsaC30598	BM005567	Treonil-tRNA sintasa

TABLA 3.1.- Continuación

n	Id EST	GenBank accn	Identificación putativa
1	CsaC30546	BM005604	Complejo asociado al polipéptido naciente (<i>Nicotiana tabacum</i>)
1	CsaC30021	BM005617	Proteína de choque térmico hsp70 (<i>O. sativa</i>)
1	CsaC30039	BM005620	Chaperonina mitocondrial (<i>Z. mays</i>)
3	CsaC30040	BM005621	Proteína DnaJ (<i>Hevea brasiliensis</i>)
1	CsaC30118	BM005624	Proteína similar a chaperonina TCP-1 (<i>A. thaliana</i>)
1	CsaC30192	BM005625	Hsp 81.4 (<i>A. thaliana</i>)
1	CsaC30514	BM005640	Precursor de chaperonina 21 (<i>L. esculentum</i>)
1	CsaC30393	BM005557	Proteína disulfuro isomerasa (alfalfa)
1	CsaC30362	BM005597	Ciclofilina (<i>P. vulgaris</i>)
1	CsaC30486	BM005601	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa (ciclofilina)
1	CsaC30067	BM005574	Proteína Ran/TC4 (<i>L. esculentum</i>)
1	CsaC30146	BM005542	Subunidad gamma de proteína transportadora de proteínas SEC61
1	CsaC30097	BM005658	Complejo translocador de proteínas sec61 (<i>A. thaliana</i>)
2	CsaC30123	BM005607	Proteína transportadora de la familia SEC1 (<i>A. thaliana</i>)
1	CsaC30163	BM005543	Proteína receptora vacuolar BP-80 (guisante)
1	CsaC30455	BM005691	Precursor de ubiquitina (cebada)
1	CsaC30481	BM005692	Proteína similar a ubiquitina (<i>A. thaliana</i>)
1	CsaC30574	BM005694	Poliubiquitina (<i>Pinus sylvestris</i>)
1	CsaC30597	BM005695	Enzima de conjugación a ubiquitina (<i>A. thaliana</i>)
1	CsaC30020	BM005649	Tiol proteasa (<i>Matricaria chamomilla</i>)
1	CsaC30179	BM005663	Pirrolidona carboxyl peptidasa putativa (<i>O. sativa</i>)
1	CsaC30201	BM005665	Proteína similar a prolil aminopeptidasa (<i>A. thaliana</i>)
1	CsaC30239	BM005667	Metionina aminopeptidasa putativa (<i>A. thaliana</i>)
1	CsaC30299	BM005550	Probable Clp proteinasa (<i>A. thaliana</i>)
2	CsaC30335	BM005672	Cistein peptidasa similar a papaina (<i>A. thaliana</i>)
1	CsaC30364	BM005677	Aspartato proteasa (<i>O. sativa</i>)
1	CsaC30459	BM005681	Proteasa similar a subtilisina (<i>L. esculentum</i>)
1	CsaC30498	BM005682	Alanina aminotransferasa (<i>H. vulgare</i>)
Transporte			
1	CsaC30382	BM005572	Proteína transportadora de nitrato (<i>Glycine max</i>)
1	CsaC30041	BM005568	Proteína transportadora de cationes (<i>Escherichia coli</i>)
1	CsaC30222	BM005569	ATPasa transportadora de cationes (<i>A. thaliana</i>)
2	CsaC30249	BM005570	ATPasa transportadora de cationes
2	CsaC30086	BM005657	Proteína similar a pirofosfatasa inorgánica (<i>A. thaliana</i>)
2	CsaC30521	BM005685	Pirofosfatasa (<i>Vigna radiata</i>)
1	CsaC30341	BM005674	Subunidad c de ATPasa tipo V (<i>N. tabacum</i>)
1	CsaC30337	BM005571	Proteína intrínseca de tonoplasto (gamma TIP) (<i>O. sativa</i>)
Organización celular			
1	CsaC30014	BM005581	Similar a pectin metilesterasa (<i>A. thaliana</i>)
3	CsaC30231	BM005586	Proteína similar a pectinesterasa (<i>A. thaliana</i>)
1	CsaC30055	BM005583	Homólogo de extensina (<i>A. thaliana</i>)
1	CsaC30354	BM005588	Proteína rica en prolina putativa (<i>A. thaliana</i>)
2	CsaC30399	BM005590	Proteína rica en prolina (<i>A. thaliana</i>)
1	CsaC30279	BM005587	Xilogucano endotransglicosilasa (<i>Asparagus officinalis</i>)

TABLA 3.1.- Continuación

n	Id EST	GenBank accn	Identificación putativa
1	CsaC30230	BM005585	Expansina (<i>Cicer arietinum</i>)
5	CsaC30415	BM005584	Profilina 3 (<i>Lilium longiflorum</i>)
2	CsaC30032	BM005582	Lámina nuclear tipo B (<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>)
1	CsaC30370	BM005589	Factor de ribosilación de ADP (<i>O. sativa</i>)
Desarrollo y regulación génica			
1	CsaC30018	BM005591	Proteína relacionada con apoptosis putativa (<i>A. thaliana</i>)
2	CsaC30022	BM005592	Proteína B12D (<i>Ipomoea batatas</i>)
1	CsaC30080	BM005593	Similar a SRG1 (<i>A. thaliana</i>)
2	CsaC30128	BM005594	Proteína de tumor controlada traduccionalmente (<i>H. brasiliensis</i>)
1	CsaC30491	BM005602	Proteína de tumor controlada traduccionalmente (<i>M. Sativa</i>)
1	CsaC30129	BM005595	Glioxalasa I (<i>O. sativa</i>)
1	CsaC30197	BM005575	Similar a regulador génico SCARECROW (<i>A. thaliana</i>)
1	CsaC30237	BM005576	Proteína del desarrollo SINA (<i>A. thaliana</i>)
1	CsaC30366	BM005598	Quinasa similar a tousled (<i>Z. mays</i>)
1	CsaC30384	BM005599	Proteína relacionada con RAS
1	CsaC30424	BM005600	Proteína B2
1	CsaC30500	BM005603	Proteína con repeticiones WD-40
1	CsaC30436	BM005690	Subunidad beta de proteína de unión a GTP regulada por auxinas (<i>N. tabacum</i>)
1	CsaC30506	BM005693	Proteína de unión a GTP (<i>P. sativum</i>)
1	CsaC30009	BM005573	Proteína con dedos de zinc (<i>A. thaliana</i>)
2	CsaC30383	BM005577	Histona desacetilasa putativa (<i>O. sativa</i>)
1	CsaC30461	BM005578	Proteína con dedo de zinc putativa (<i>C. arietinum</i>)
1	CsaC30507	BM005579	Histona 2B (<i>A. officinalis</i>)
1	CsaC30512	BM005580	Similar a proteína de unión a ARN (<i>A. thaliana</i>)
Percepción y transducción de señales			
1	CsaC30030	BM005605	Similitud con proteína quinasa (<i>A. thaliana</i>)
1	CsaC30243	BM005611	Proteína con dominio quinasa de eucariotas (<i>O. sativa</i>)
1	CsaC30493	BM027771	Proteína quinasa putativa de <i>A. thaliana</i>
2	CsaC30044	BM005606	Proteína similar a receptor quinasa (<i>A. thaliana</i>)
1	CsaC30171	BM005609	Proteína asociada a receptor putativa (<i>O. sativa</i>)
2	CsaC30170	BM005608	Proteína 14-3-3 (<i>Solanum tuberosum</i>)
1	CsaC30227	BM005610	Proteína ER33 (<i>L. esculentum</i>)
1	CsaC30351	BM005612	Inositol 1,3,4-trisfosfato 5/6 quinasa (<i>A. thaliana</i>)
3	CsaC30378	BM005613	Calmodulina regulada por auxinas (<i>V. radiata</i>)
2	CsaC30502	BM005614	Calmodulina (<i>Phaseolus vulgaris</i>)
Respuesta a patógenos y estrés			
3	CsaC30003	BM005615	Homólogo de gamma tionina
3	CsaC30027	BM005619	Tránsito 1 regulado por giberelinas (<i>O. sativa</i>)
20	CsaC30015	BM005616	Quitinasa ácida (<i>Eleagnus umbellata</i>)
1	CsaC30451	BM005637	Quitinasa (<i>Gladiolus gandavensis</i>)
1	CsaC30607	BM005643	Proteína similar a taumatina (<i>A. thaliana</i>)
1	CsaC30454	BM005638	Inhibidor de poligalacturonasa
2	CsaC30205	BM005626	Inhibidor de poligalacturonasa (<i>Actinidia deliciosa</i>)
1	CsaC30092	BM005623	Precursor de proteína alergénica de semilla RA5
1	CsaC30266	BM005628	Respuesta a elicitor (<i>O. sativa</i>)
1	CsaC30575	BM005641	Inducida por estrés o heridas (<i>A. thaliana</i>)

TABLA 3.1.- Continuación

n	Id EST	GenBank accn	Identificación putativa
1	CsaC30024	BM005618	Proteína de resistencia tipo NBS-LRR (<i>O. sativa</i>)
1	CsaC30407	BM005633	RNAsa putativa (<i>O. sativa</i>)
2	CsaC30426	BM005635	SGS3 (<i>A. thaliana</i>)
1	CsaC30322	BM005596	Proteína LEA (abundante en embriogénesis tardía) (<i>A. thaliana</i>)
1	CsaC30410	BM005634	Homólogo de proteína de respuesta a estrés (<i>A. thaliana</i>)
1	CsaC30368	BM005630	Proteína inducida por luz temprana ELIP (<i>A. thaliana</i>)
1	CsaC30449	BM005636	Proteína inducida por estrés y ácido abscísico (<i>O. sativa</i>)
1	CsaC30485	BM005639	Proteína de maduración de estrés abscísico (<i>Prunus armeniaca</i>)
1	CsaC30213	BM005627	Proteína de respuesta a baja temperatura y sal (<i>O. sativa</i>)
1	CsaC30046	BM005622	Proteína similar a metalotioneína (<i>Typha latifolia</i>)
1	CsaC30380	BM005631	Proteína similar a metalotioneína (<i>Musa acuminata</i>)
1	CsaC30581	BM005642	Metalotioneína tipo 1 (<i>Fritillaria agrestis</i>)
4	CsaC30387	BM005632	Catalasa (<i>O. sativa</i>)
2	CsaC30336	BM005629	Dehidroascorbato reductasa (<i>A. thaliana</i>)
1	CsaC30065	BM005655	Formaldehído deshidrogenasa dependiente de glutatión (<i>Z. mays</i>)
Metabolismo			
1	CsaC30038	BM005652	Fructoquinasa (<i>S. tuberosum</i>)
2	CsaC30295	BM005670	Fosfofructoquinasa
2	CsaC30358	BM005675	Enolasa (<i>R. communis</i>)
1	CsaC30395	BM005678	Subunidad hierro azufre de succinato deshidrogenasa (<i>Z. mays</i>)
1	CsaC30359	BM005676	Malato deshidrogenasa (<i>A. thaliana</i>)
1	CsaC30031	BM005651	Malato deshidrogenasa (<i>C. arietinum</i>)
1	CsaC30006	BM005647	Subunidad 2 NADH deshidrogenasa (<i>Bos Taurus</i>)
1	CsaC30499	BM005683	NADH:ubiquinona oxidoreductasa (<i>S. tuberosum</i>)
1	CsaC30501	BM005684	Citocromo c oxidasa (<i>A. thaliana</i>)
1	CsaC30310	BM005671	Subunidad Vc citocromo c oxidasa (<i>O. sativa</i>)
1	CsaC30623	BM005689	Subunidad epsilon de ATPasa mitocondrial (<i>A. thaliana</i>)
2	CsaC30016	BM005648	ATP sintasa putativa (<i>A. thaliana</i>)
1	CsaC30339	BM005673	Fosfoglucomutasa plastídica (<i>P. sativum</i>)
1	CsaC30023	BM005650	UDP glucosa pirofosforilasa
1	CsaC30047	BM005653	Fosforilasa de almidón (<i>S. tuberosum</i>)
1	CsaC30053	BM005654	Sacarosa sintasa (<i>T. gesneriana</i>)
1	CsaC30525	BM005686	Trehalosa-6-fosfato sintasa (<i>A. thaliana</i>)
1	CsaC30072	BM005656	Proteína precursora de lipasa (<i>A. thaliana</i>)
1	CsaC30119	BM005660	Proteína similar a diaminopimelato descarboxilasa (<i>A. thaliana</i>)
1	CsaC30135	BM005661	Similar a 4-cumarato CoA ligasa
1	CsaC30145	BM005662	Ornitina carbamoiltransferasa (<i>A. thaliana</i>)
1	CsaC30184	BM005664	IAA aminoácido hidrolasas
1	CsaC30232	BM005666	Glutamina-fructosa-6-fosfato transaminasa (<i>A. thaliana</i>)
1	CsaC30271	BM005668	Homólogo de oxidoreductasa (<i>A. thaliana</i>)
1	CsaC30293	BM005669	Proteína similar a acetiltransferasa (<i>A. thaliana</i>)

TABLA 3.1.- Continuación

n	Id EST	GenBank accn	Identificación putativa
1	CsaC30420	BM005679	Alfa galactosidasa (<i>L. esculentum</i>)
1	CsaC30432	BM005680	Flavonol sulfotransferasa (<i>A. thaliana</i>)
1	CsaC30566	BM005687	Glutamato deshidrogenasa (<i>B. napus</i>)
1	CsaC30569	BM005688	Metiltransferasa (<i>P. armeniaca</i>)
Otras			
1	CsaC30008	CB250220	ARN ribosómico 26S (<i>Liquidambar styraciflua</i>)
1	CsaC30029	CB250221	ARN ribosómico 26S subunidad larga (<i>Acorus gramineus</i>)
1	CsaC30036	CB250222	ARN ribosómico 26S (<i>Lambertia inermis</i>)
1	CsaC30059	CB250223	ARN ribosómico 26S (<i>Leea guineensis</i>)
10	CsaC30068	CB250224	ADN repetido disperso (<i>C. vernus</i>)
1	CsaC30069	CB250225	ADN microsatélite (<i>Coffea arabica</i>)
1	CsaC30085	CB250226	ARN ribosómico 26S (<i>Sullivantia oregana</i>)
7	CsaC30133	CB250227	ARN ribosómico 26S (<i>Citrus limon</i>)
2	CsaC30203	CB250228	ARN ribosómico 26S (<i>Trochodendron aralioides</i>)
2	CsaC30377	BM005644	ATP sintasa plastídica (<i>Spinacea oleracea</i>)
1	CsaC30396	BM005645	Genoma de cloroplasto (<i>Triticum aestivum</i>)
1	CsaC30504	BM005646	Homólogo de proteína ssb de cloroplasto (<i>N. tabacum</i>)
Función desconocida			
1	CsaC30061	BM027639	Proteína hipotética TSK22 de <i>A. thaliana</i>
1	CsaC30088	BM027645	Proteína desconocida de <i>A. thaliana</i>
1	CsaC30089	BM027646	Proteína desconocida de <i>A. thaliana</i>
1	CsaC30115	BM027655	Proteína hipotética de <i>A. thaliana</i>
1	CsaC30206	BM027692	Proteína hipotética T20L15.20 de <i>A. thaliana</i>
1	CsaC30208	BM027693	Proteína hipotética F20M13.60 de <i>A. thaliana</i>
1	CsaC30252	BM027707	Proteína hipotética de <i>A. thaliana</i>
1	CsaC30253	BM027708	Proteína hipotética F4I10.50 de <i>A. thaliana</i>
1	CsaC30334	BM027729	Proteína hipotética T30N20.130 de <i>A. thaliana</i>
2	CsaC30412	BM027738	Proteína hipotética T22J18.13 de <i>A. thaliana</i>
4	CsaC30388	BM027739	Proteína hipotética de <i>Antirrhinum hispanicum</i>
1	CsaC30458	BM027763	Proteína hipotética F4F15.340 de <i>A. thaliana</i>
1	CsaC30476	BM027767	Proteína hipotética de <i>A. thaliana</i>
1	CsaC30479	BM027768	Proteína desconocida de <i>A. thaliana</i>
1	CsaC30489	BM027770	Proteína hipotética F20B18.240 de <i>A. thaliana</i>
1	CsaC30511	BM027773	T1N15.6 de <i>A. thaliana</i>
1	CsaC30527	BM027777	Proteína desconocida de <i>A. thaliana</i>
1	CsaC30624	BM027793	T5E21.13 de <i>A. thaliana</i>
1	CsaC30001	BM027627	Similitud no significativa (sns)
1	CsaC30002	BM027628	Sns
1	CsaC30007	BM027629	Sns
1	CsaC30012	BM027630	Sns
1	CsaC30019	BM027631	Sns
1	CsaC30025	BM027632	Sns
1	CsaC30026	BM027633	Sns
1	CsaC30028	BM027634	Sns
1	CsaC30033	BM027635	Sns
1	CsaC30042	BM027636	Sns
2	CsaC30051	BM027637	Sns
1	CsaC30054	BM027638	Sns
1	CsaC30063	BM027640	Sns
1	CsaC30070	BM027641	Sns
2	CsaC30073	BM027642	Sns

TABLA 3.1.- Continuación

n	Id EST	GenBank accn	Identificación putativa
1	CsaC30083	BM027643	Sns
1	CsaC30087	BM027644	Sns
1	CsaC30093	BM027647	Sns
1	CsaC30094	BM027648	Sns
1	CsaC30101	BM027649	Sns
1	CsaC30108	BM027650	Sns
1	CsaC30109	BM027651	Sns
1	CsaC30110	BM027652	Sns
1	CsaC30111	BM027653	Sns
1	CsaC30113	BM027654	Sns
1	CsaC30120	BM027656	Sns
1	CsaC30121	BM027657	Sns
1	CsaC30124	BM027658	Sns
1	CsaC30125	BM027659	Sns
1	CsaC30127	BM027660	Sns
1	CsaC30131	BM027661	Sns
1	CsaC30132	BM027662	Sns
1	CsaC30134	BM027663	Sns
1	CsaC30136	BM027664	Sns
1	CsaC30137	BM027665	Sns
1	CsaC30139	BM027666	Sns
1	CsaC30140	BM027667	Sns
1	CsaC30142	BM027668	Sns
1	CsaC30143	BM027669	Sns
1	CsaC30144	BM027670	Sns
2	CsaC30150	BM027671	Sns
1	CsaC30153	BM027672	Sns
1	CsaC30154	BM027673	Sns
1	CsaC30155	BM027674	Sns
1	CsaC30157	BM027675	Sns
1	CsaC30158	BM027676	Sns
1	CsaC30160	BM027677	Sns
1	CsaC30161	BM027678	Sns
1	CsaC30164	BM027679	Sns
1	CsaC30166	BM027680	Sns
1	CsaC30167	BM027681	Sns
1	CsaC30168	BM027682	Sns
1	CsaC30169	BM027683	Sns
1	CsaC30175	BM027684	Sns
1	CsaC30176	BM027685	Sns
1	CsaC30183	BM027686	Sns
1	CsaC30193	BM027687	Sns
1	CsaC30196	BM027688	Sns
3	CsaC30323	BM027689	Sns
1	CsaC30199	BM027690	Sns
1	CsaC30200	BM027691	Sns
1	CsaC30209	BM027694	Sns
1	CsaC30211	BM027695	Sns
1	CsaC30212	BM027696	Sns
1	CsaC30214	BM027697	Sns
1	CsaC30223	BM027698	Sns
1	CsaC30228	BM027699	Sns
1	CsaC30233	BM027700	Sns

TABLA 3.1.- Continuación

n	Id EST	GenBank accn	Identificación putativa
1	CsaC30235	BM027701	Sns
1	CsaC30236	BM027702	Sns
1	CsaC30238	BM027703	Sns
1	CsaC30240	BM027704	Sns
1	CsaC30241	BM027705	Sns
1	CsaC30242	BM027706	Sns
1	CsaC30255	BM027709	Sns
1	CsaC30256	BM027710	Sns
1	CsaC30257	BM027711	Sns
1	CsaC30261	BM027712	Sns
1	CsaC30264	BM027713	Sns
1	CsaC30272	BM027714	Sns
1	CsaC30273	BM027715	Sns
1	CsaC30275	BM027716	Sns
1	CsaC30276	BM027717	Sns
1	CsaC30282	BM027718	Sns
1	CsaC30283	BM027719	Sns
2	CsaC30284	BM027720	Sns
1	CsaC30286	BM027721	Sns
1	CsaC30288	BM027722	Sns
1	CsaC30300	BM027723	Sns
1	CsaC30302	BM027724	Sns
1	CsaC30309	BM027725	Sns
1	CsaC30313	BM027726	Sns
1	CsaC30326	BM027727	Sns
1	CsaC30330	BM027728	Sns
1	CsaC30338	BM027730	Sns
1	CsaC30342	BM027731	Sns
1	CsaC30344	BM027732	Sns
1	CsaC30353	BM027733	Sns
1	CsaC30355	BM027734	Sns
1	CsaC30357	BM027735	Sns
1	CsaC30369	BM027736	Sns
1	CsaC30372	BM027737	Sns
1	CsaC30389	BM027740	Sns
1	CsaC30391	BM027741	Sns
1	CsaC30392	BM027742	Sns
2	CsaC30468	BM027743	Sns
1	CsaC30408	BM027744	Sns
1	CsaC30411	BM027745	Sns
1	CsaC30416	BM027746	Sns
1	CsaC30418	BM027747	Sns
1	CsaC30419	BM027748	Sns
1	CsaC30422	BM027749	Sns
1	CsaC30425	BM027750	Sns
1	CsaC30429	BM027751	Sns
1	CsaC30431	BM027752	Sns
1	CsaC30435	BM027753	Sns
1	CsaC30437	BM027754	Sns
1	CsaC30438	BM027755	Sns
1	CsaC30439	BM027756	Sns
1	CsaC30440	BM027757	Sns
1	CsaC30441	BM027758	Sns

TABLA 3.1.- Continuación

n	Id EST	GenBank accn	Identificación putativa
1	CsaC30443	BM027759	Sns
1	CsaC30445	BM027760	Sns
1	CsaC30452	BM027761	Sns
1	CsaC30453	BM027762	Sns
1	CsaC30464	BM027764	Sns
1	CsaC30471	BM027765	Sns
1	CsaC30474	BM027766	Sns
1	CsaC30480	BM027769	Sns
1	CsaC30509	BM027772	Sns
1	CsaC30513	BM027774	Sns
1	CsaC30517	BM027775	Sns
1	CsaC30523	BM027776	Sns
1	CsaC30536	BM027778	Sns
1	CsaC30538	BM027779	Sns
1	CsaC30540	BM027780	Sns
1	CsaC30541	BM027781	Sns
1	CsaC30547	BM027782	Sns
1	CsaC30558	BM027783	Sns
1	CsaC30564	BM027784	Sns
1	CsaC30570	BM027785	Sns
1	CsaC30573	BM027786	Sns
1	CsaC30580	BM027787	Sns
1	CsaC30585	BM027788	Sns
1	CsaC30589	BM027789	Sns
1	CsaC30615	BM027790	Sns
1	CsaC30620	BM027791	Sns
1	CsaC30622	BM027792	Sns
1	CsaC30625	BM027794	Sns
1	CsaC30626	BM027795	Sns
1	CsaC30630	BM027796	Sns
1	CsaC30631	BM027797	Sns
1	CsaC30632	BM027798	Sns

TABLA 3.1.- Continuación

n	Id EST	GenBank accn	Identificación putativa
C4			
Elementos transponibles			
1	CsaC4100268	BM956290	Retroelemento putativo (<i>O. sativa</i>)
1	CsaC4103860	BM956293	Retroelemento putativo (<i>O. sativa</i>)
1	CsaC43610	BM956292	Poliproteína relacionada con retrovirus de transposón TNT 1-94
1	CsaC4105496	BM956291	Precursor gag-pol putativo (<i>O. sativa</i>)
1	CsaC4105602	BM956289	Transposasa (<i>Pseudomonas putida</i>)
Síntesis proteica, plegado y degradación			
2	CsaC43553	BM956296	PoliA polimerasa putativa (<i>A. thaliana</i>)
1	CsaC43324	BM956297	ARN metiltransferasa putativa (<i>A. thaliana</i>)
1	CsaC43631	BM956299	ARN polimerasa dirigida por ADN de cloroplasto
1	CsaC4105494	BM956467	Subunidad pequeña de factor auxiliar U2 snRNP de <i>A. thaliana</i>
1	CsaC43621	BM956298	Similar a ribonucleoproteína (<i>A. thaliana</i>)
1	CsaC43652	BM956300	Proteína ribosómica L5
1	CsaC43461	CB250229	Proteína ribosómica L33 (<i>C. sativa</i>)
1	CsaC4100422	CB250230	Complejo asociado a polipéptido naciente (<i>Pinus taeda</i>)
1	CsaC43333	BM956301	Complejo asociado a polipéptido naciente (<i>A. thaliana</i>)
1	CsaC43555	CB250231	HSC70-T7 (<i>A. thaliana</i>)
1	CsaC4107339	CB250232	Tiol proteasa (<i>Matricaria chamomilla</i>)
1	CsaC4103856	BM956468	O-sialoglicoproteína endopeptidasa putativa de <i>E. coli</i>
1	CsaC43232	BM956328	Proteína de conjugación a ubiquitina (<i>Avicennia marina</i>)
Transporte			
1	CsaC43622	CB250233	Proteína transportadora de cationes (<i>E. coli</i>)
1	CsaC43559	BM956335	Pirofosfatasa inorgánica putativa (<i>A. thaliana</i>)
1	CsaC43500	BM956302	Proteína de canal de agua (<i>O. sativa</i>)
1	CsaC43632	BM956303	Proteína integral de membrana (canal de agua) (<i>Z. mays</i>)
1	CsaC43630	BM956329	Synaptobrevina 7B (<i>A. thaliana</i>)
1	CsaC43634	BM956316	Similar a proteína de unión a oxisterol (<i>A. thaliana</i>)
1	CsaC4107159	BM956333	Proteína similar a transportador de aminoácidos (<i>A. thaliana</i>)
1	CsaC43516	BM956334	Proteína transportadora putativa (<i>A. thaliana</i>)
4	CsaC43245	CB250234	Proteína transportadora putativa (<i>A. thaliana</i>)
Organización celular			
1	CsaC43599	BM956313	Lacasa (difenol oxidasa) (<i>A. thaliana</i>)
1	CsaC4103851	BM956314	Proteína rica en prolina (<i>Xenopus laevis</i>)
1	CsaC43480	BM956315	Proteína rica en prolina putativa (<i>A. thaliana</i>)
1	CsaC43484	BM956312	Expansina 3 (<i>Zinnia elegans</i>)
1	CsaC43776	BM956311	Colágeno alfa
1	CsaC43456	BM956318	Precursor de colágeno alfa
1	CsaC4107174	BM956317	Similar a proteína de unión a lípido calcio (<i>A. thaliana</i>)
Desarrollo y regulación génica			
1	CsaC4107461	BM956304	XRN3 (<i>A. thaliana</i>)
2	CsaC43623	BM956305	YABBY 2 (<i>A. thaliana</i>)

TABLA 3.1.- Continuación

n	Id EST	GenBank accn	Identificación putativa
1	CsaC43688	BM956307	Proteína de unión a ADN (<i>A. thaliana</i>)
1	CsaC43625	BM956308	Proteína de unión a gancho AT de ADN (<i>A. thaliana</i>)
1	CsaC43687	BM956309	Remorina 1 (<i>L. esculentum</i>)
1	CsaC43306	BM956310	Proteína similar a Yippee (<i>A. thaliana</i>)
1	CsaC4107442	BM956306	Proteína similar a NAM (no apical meristem) (<i>A. thaliana</i>)
1	CsaC4103854	BM956319	Proteína relacionada con embriogénesis somática (<i>Dactylis glomerata</i>)
Percepción y transducción de señales			
1	CsaC43575	BM956320	Similar a receptor quinasa (<i>A. thaliana</i>)
Respuesta a patógenos y estrés			
5	CsaC4107329	CB250235	Quitinasa (<i>G. gandavensis</i>)
1	CsaC43459	BM956322	Proteína de transferencia de lípidos (algodón)
1	CsaC43560	BM956321	Proteína inducida por estrés de deshidratación (<i>B. napus</i>)
1	CsaC43604	CB250236	CsaC30581 Metalotioneína
1	CsaC4107426	BM956331	Alcohol deshidrogenasa 2 (<i>Vitis vinifera</i>)
1	CsaC4107151	BM956332	Alcohol deshidrogenasa 7 (<i>Vitis vinifera</i>)
Metabolismo			
1	CsaC4107188	BM956338	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (<i>A. thaliana</i>)
1	CsaC454	BM956340	Piruvato quinasa
1	CsaC43557	BM956336	Citocromo c oxidasa (<i>A. thaliana</i>)
1	CsaC43556	BM956337	Subunidad 6b citocromo c oxidasa (<i>O. sativa</i>)
1	CsaC4107464	BM956325	Nucleótido azúcar epimerasa (<i>A. thaliana</i>)
1	CsaC4103855	BM956326	Metaloproteasa-desintegrina meltrin beta (<i>H. sapiens</i>)
1	CsaC4107425	BM956327	Lectina de unión a manano (<i>Crocus sativus</i>)
1	CsaC43471	BM956330	Proteína fosfatasa 2C (<i>A. thaliana</i>)
1	CsaC435711	BM956339	Enzima biosintética de tiazol, precursor del cloroplasto
1	CsaC43466	BM956341	NEC -1 (<i>Petunia x hybrida</i>)
1	CsaC4105600	BM956342	Histidinol fosfatasa e imidazol-glicerol fosfato deshidratasa (<i>Yersinia pestis</i>)
1	CsaC43637	BM956343	Eugenol O-metiltransferasa (<i>Ocimum basilicum</i>)
1	CsaC43265	BM956344	Glutamina sintetasa citosólica (<i>G. max</i>)
1	CsaC43490	BM956345	Proteína asociada a prolina sintetasa (<i>A. thaliana</i>)
1	CsaC43504	BM956346	Enzima de biosíntesis de siringomicina (<i>A. thaliana</i>)
1	CsaC43253	BM956347	Proteína similar a CRS-2 (<i>A. thaliana</i>)
1	CsaC4105495	BM956348	Fosfoenol piruvato sintetasa (<i>E. coli</i>)
Otras			
1	CsaC4107163	BM956294	ARN ribosómico 26S (<i>Schizophragma hydrangeoides</i>)
1	CsaC43554	BM956295	ARN ribosómico 18S (<i>Bonplandia geminiflora</i>)
1	CsaC43251	BM956449	Subunidad pequeña de ARN ribosómico de <i>Morchella elata</i>
1	CsaC4103861	BM956323	Proteína CP 47 Fotosistema II (<i>Illicium parviflorum</i>)
1	CsaC43230	BM956324	Genoma de cloroplasto (<i>T. aestivum</i>)
Función desconocida			
1	CsaC43568	BM956349	Proteína desconocida de <i>A. thaliana</i>
1	CsaC43777	BM956361	At2g48140/F11L15.4 de <i>A. thaliana</i>

TABLA 3.1.- Continuación

n	Id EST	GenBank accn	Identificación putativa
1	CsaC43463	BM956377	Proteína putativa de <i>A. thaliana</i>
1	CsaC43655	BM956385	At1g27700/T22C5_14 de <i>A. thaliana</i>
1	CsaC4100469	BM956409	Proteína desconocida de <i>A. thaliana</i>
1	CsaC43502	BM956410	Proteína putativa de <i>A. thaliana</i>
1	CsaC4107155	BM956415	Proteína con dominio de unión a metilo putativa de <i>Z. mays</i>
1	CsaC43574	BM956417	Proteína desconocida de <i>A. thaliana</i>
1	CsaC4100409	BM956425	Proteína desconocida de <i>A. thaliana</i>
1	CsaC4105485	BM956428	Probable enzima de <i>E. coli</i>
1	CsaC4100420	BM956431	Proteína desconocida de <i>O. sativa</i>
1	CsaC43322	BM956432	Proteína putativa de <i>A. thaliana</i>
1	CsaC43626	BM956436	Proteína desconocida de <i>A. thaliana</i>
1	CsaC43629	BM956438	Proteína desconocida de <i>A. thaliana</i>
1	CsaC4107423	BM956439	Proteína desconocida de <i>A. thaliana</i>
1	CsaC4107443	BM956445	Proteína putativa de <i>A. thaliana</i>
1	CsaC4107437	BM956447	Proteína putativa de <i>A. thaliana</i>
1	CsaC43481	BM956450	Proteína desconocida de <i>A. thaliana</i>
1	CsaC43774	BM956451	Proteína hipotética de <i>A. thaliana</i>
1	CsaC4107467	BM956457	Proteína hipotética de <i>A. thaliana</i>
1	CsaC4107466	CB250237	CsaC30480
1	CsaC4103863	CB250238	CsaC30471
2	CsaC43474	CB250239	CsaC30513
1	CsaC432860	BM956350	Sns
1	CsaC43675	BM956351	Sns
1	CsaC4107194	BM956352	Sns
1	CsaC43237	BM956353	Sns
1	CsaC4107158	BM956354	Sns
1	CsaC4100884	BM956355	Sns
1	CsaC43600	BM956356	Sns
1	CsaC4100603	BM956357	Sns
1	CsaC4100419	BM956358	Sns
1	CsaC4100476	BM956359	Sns
1	CsaC43323	BM956360	Sns
1	CsaC4100619	BM956362	Sns
1	CsaC4100626	BM956363	Sns
1	CsaC43294	BM956364	Sns
1	CsaC43285	BM956365	Sns
1	CsaC43280	BM956366	Sns
1	CsaC43291	BM956367	Sns
1	CsaC43635	BM956368	Sns
1	CsaC43470	BM956369	Sns
1	CsaC43227	BM956370	Sns
1	CsaC43691	BM956371	Sns
1	CsaC4100529	BM956372	Sns
1	CsaC4107192	BM956373	Sns
1	CsaC43240	BM956374	Sns
1	CsaC43692	BM956375	Sns
1	CsaC4100418	BM956376	Sns
1	CsaC43244	BM956378	Sns
1	CsaC43250	BM956379	Sns
1	CsaC4105456	BM956380	Sns
1	CsaC43628	BM956381	Sns
1	CsaC43241	BM956382	Sns

TABLA 3.1.- Continuación

n	Id EST	GenBank accn	Identificación putativa
1	CsaC43261	BM956383	Sns
1	CsaC43400	BM956384	Sns
1	CsaC43278	BM956386	Sns
1	CsaC43231	BM956387	Sns
1	CsaC43331	BM956388	Sns
1	CsaC43501	BM956389	Sns
1	CsaC43319	BM956390	Sns
1	CsaC43252	BM956391	Sns
1	CsaC43295	BM956392	Sns
1	CsaC43243	BM956393	Sns
1	CsaC43233	BM956394	Sns
1	CsaC43571	BM956395	Sns
1	CsaC43296	BM956396	Sns
1	CsaC43624	BM956397	Sns
1	CsaC4100414	BM956398	Sns
1	CsaC43248	BM956399	Sns
1	CsaC43679	BM956400	Sns
1	CsaC4100417	BM956401	Sns
1	CsaC43325	BM956402	Sns
1	CsaC43335	BM956403	Sns
1	CsaC43264	BM956404	Sns
1	CsaC4100880	BM956405	Sns
1	CsaC43786	BM956406	Sns
1	CsaC43674	BM956407	Sns
1	CsaC4107166	BM956408	Sns
1	CsaC43254	BM956411	Sns
1	CsaC43566	BM956412	Sns
1	CsaC4100609	BM956413	Sns
1	CsaC4100522	BM956414	Sns
1	CsaC43476	BM956416	Sns
1	CsaC43290	BM956418	Sns
1	CsaC4100470	BM956419	Sns
1	CsaC4100879	BM956420	Sns
1	CsaC4100274	BM956421	Sns
1	CsaC4100474	BM956422	Sns
1	CsaC4100402	BM956423	Sns
1	CsaC4100614	BM956424	Sns
1	CsaC4107193	BM956426	Sns
1	CsaC4107164	BM956427	Sns
1	CsaC4105313	BM956429	Sns
1	CsaC43690	BM956430	Sns
1	CsaC43249	BM956433	Sns
1	CsaC4100261	BM956434	Sns
1	CsaC43678	BM956435	Sns
1	CsaC4107147	BM956437	Sns
1	CsaC43247	BM956440	Sns
1	CsaC43482	BM956441	Sns
1	CsaC4107176	BM956442	Sns
1	CsaC43483	BM956443	Sns
1	CsaC4100505	BM956444	Sns
1	CsaC4100423	BM956446	Sns
1	CsaC4107433	BM956448	Sns
1	CsaC43239	BM956452	Sns

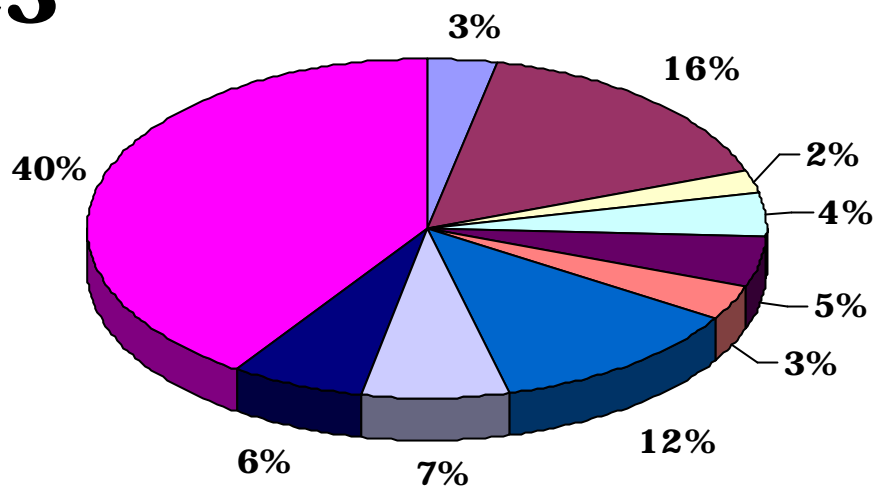
TABLA 3.1.- Continuación

n	Id EST	GenBank accn	Identificación putativa
1	CsaC43262	BM956453	Sns
1	CsaC4107161	BM956454	Sns
1	CsaC4107338	BM956455	Sns
1	CsaC4107332	BM956456	Sns
1	CsaC43289	BM956458	Sns
1	CsaC43234	BM956459	Sns
1	CsaC4100613	BM956460	Sns
1	CsaC4103864	BM956461	Sns
1	CsaC43242	BM956462	Sns
1	CsaC43293	BM956463	Sns
1	CsaC43551	BM956464	Sns
1	CsaC43458	BM956465	Sns
1	CsaC4100264	BM956466	Sns

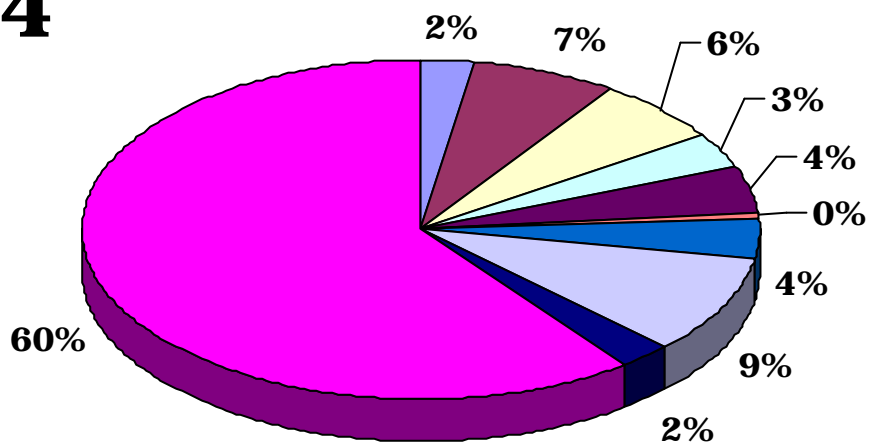
TABLA 3.2.- Número de ESTs asignados a cada categoría funcional y porcentaje sobre el número total de clones secuenciados de cada estadio.

	C3		C4	
	n	%	n	%
Elementos transponibles	15	3,3	5	2,4
Síntesis proteica	71	15,8	14	6,9
Transporte	11	2,4	12	6,0
Organización celular	18	4,0	7	3,5
Desarrollo y regulación génica	22	4,9	9	4,5
Percepción y transducción de señales	15	3,3	1	0,5
Respuesta a patógenos y estrés	54	12,0	8	4,0
Metabolismo	32	7,1	19	9,4
Otras	29	6,5	5	2,5
Desconocidas	182	40,5	121	60,2
Total	449		201	

C3



C4



- | | |
|----------------------------------|--|
| ■ Elementos transponibles | ■ Síntesis proteica |
| ■ Transporte | ■ Organización celular |
| ■ Desarrollo y regulación génica | ■ Percepción y transducción de señales |
| ■ Respuesta a patógenos y estrés | ■ Metabolismo |
| ■ Otras | ■ Función desconocida |

FIGURA 3.3.- Representación gráfica del porcentaje de ESTs incluido en cada categoría funcional

Únicamente 11 de las secuencias halladas se encontraron presentes en los dos estadios de desarrollo (tabla 3.3), entre las que se incluyen una proteína ribosómica, dos secuencias con actividad de chaperoninas, una proteasa, una quitinasa, una metalotioneína y una proteína transportadora, siendo el resto secuencias que no presentaron similitudes significativas.

Tabla 3.3.- Secuencias presentes en los dos estadios de desarrollo. Id C3: identificación del EST en el estadio C3; n C3: número de clones con esa secuencia hallados en C3; Id C4: identificación del EST en el estadio C4; n C4: número de clones con esa secuencia hallados en C4; Identificación putativa: secuencia con la que mostraron mayor similitud.

Id C3	n C3	Id C4	n C4	Identificación putativa
CsaC30218	1	CsaC43461	1	Proteína ribosómica L33 (<i>Castanea sativa</i>)
CsaC30546	1	CsaC4100422	1	Complejo asociado a polipéptido naciente (<i>Pinus taeda</i>)
CsaC30021	1	CsaC43555	1	HSC70-T7 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
CsaC30020	1	CsaC4107339	1	Tiol proteasa (<i>Matricaria chamomilla</i>)
CsaC30041	1	CsaC43622	1	Proteína transportadora de cationes (<i>Escherichia coli</i>)
CsaC30175	1	CsaC43245	4	Proteína transportadora putativa (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
CsaC30451	1	CsaC4107329	5	Quitinasa (<i>Gladiolus gandavensis</i>)
CsaC30581	1	CsaC43604	1	Metalotioneína
CsaC30480	1	CsaC4107466	1	Similitud no significativa
CsaC30471	1	CsaC4103863	1	Similitud no significativa
CsaC30513	1	CsaC43474	2	Similitud no significativa

Este es el primer estudio que se realiza sobre la genómica funcional del azafrán, en concreto sobre su órgano propagador, el cormo. La falta de publicaciones relativas a este órgano conlleva que se conozca muy poco sobre su expresión génica y sobre procesos fisiológicos tales como la acumulación de reservas o la dormancia. En este trabajo se pretende estudiar la expresión de genes durante el desarrollo, lo cual aportará una información valiosa para la caracterización genómica del azafrán, y para una futura mejora genética de esta especie. Para este estudio se seleccionaron cormos en estadio C3 por la importancia del proceso de acumulación de reservas, pues de ello dependerá la brotación de las

yemas y la consiguiente reproducción vegetativa de la planta. También se seleccionaron cormos en estadio C4, pues éste es el material utilizado para la siembra del azafrán, y es interesante su caracterización.

En los siguientes apartados se describen aquellas secuencias que presentaron similitudes notables.

3.2.2.- Elementos transponibles

En esta categoría se han incluido todos aquellos elementos móviles del genoma, tanto de tipo I o retrotransposones, propagados mediante un proceso de retrotranscripción, como de tipo II o transposones, propagados directamente en forma de ADN. En el cormo de azafrán en estadio C3, se han encontrado 14 ESTs que mostraron similitud con retrotransposones de varios tipos (tipo *copia*, retroelementos sin LTR y otros retrotransposones putativos), además de una secuencia que mostró similitud con un transposón putativo (tabla 3.4). En la genoteca del estadio C4 únicamente se encontraron 4 secuencias con similitud con retrotransposones y una secuencia que mostró similitud con la transposasa, enzima codificada por ellos mismos y responsable de insertar el transposón en un sitio diferente del genoma. En total, el número de clones que mostraron similitud con elementos transponibles en el estadio C3 representó alrededor de un 3,3 %, mientras que en el estadio C4 fue de alrededor de un 2,4 % sobre el total de los clones secuenciados.

Los retrotransposones son muy abundantes en el reino vegetal, principalmente entre las especies de las gramíneas y en general en las monocotiledóneas (Vicient y col., 2001), y sus familias activas tienen el potencial de ser los mayores contribuyentes a la variación del tamaño del genoma. Pueden resultar importantes factores relacionados con su organización y evolución (Bennetzen, 1996; Kumar y Bennetzen, 1999; Wang y col., 1999).

TABLA 3.4.- ESTs con similitud con elementos transponibles. n: número de ESTs. Id putativa: identificación putativa en función de las similitudes encontradas.

C3		C4	
n	Id putativa	n	Id putativa
2	Retrotransposón tipo <i>copia</i>		
1	Retroelemento sin LTR		
3	Proteína gag-pol	1	Precursor gag-pol
5	Otras poliproteínas	1	Poliproteína relacionada con retrovirus
3	Otros retroelementos	2	Retroelemento putativo
1	Transposón putativo	1	Transposasa

En el estudio de expresión de genes en el cormo de azafrán en estadio C3, se han encontrado dos secuencias que mostraron similitud con retrotransposones del tipo *copia*¹. Este tipo de retrotransposones está distribuido ampliamente entre las plantas superiores (Voytas y col., 1992), y presenta una gran heterogeneidad en su secuencia, número de copias y actividad transcripcional y traduccional (Voytas y Ausubel, 1988; Flavell y col., 1992; Flavell y col., 1997; Heslop-Harrison y col., 1997; Stuart-Rogers y Flavell, 2001; Terol y col., 2001). Por sus características, estos elementos pueden ser utilizados como marcadores moleculares para el mapeo de genomas y para el estudio de la biodiversidad genética en plantas (Kumar y col., 1997), aspecto muy interesante en el caso del azafrán, ya que su genoma está muy poco estudiado y existen grandes controversias en cuanto a la evolución de esta especie.

Múltiples estudios han mostrado que los elementos transponibles existen en el genoma en estado latente, y están sujetos a reactivación por medios bióticos y abióticos (Hirochika y col., 1996; Wessler, 1996, 2001; Mhiri y col., 1997; Grandbastien, 1998; Takeda y col., 1998; Beguiristain y col., 2001). En *Arabidopsis*, alrededor de un 10 % de su genoma está compuesto por elementos transponibles, si bien, únicamente un 4 % de éstos se han identificado como ESTs, indicando

¹ BM005527, BM005538

que la mayoría de ellos no se encuentran activos (*The Arabidopsis Genome Initiative*, 2000). Incluso en el elemento *BARE-1* de cebada, un retrotransposón tipo *copia* y probablemente uno de los mejor estudiados (Vicient y col., 1999), se ha descrito un patrón de expresión diferente en función de pequeñas diferencias microclimáticas (Kalendar y col., 2000; Wendel y Wessler, 2000). El cormo del azafrán es un órgano subterráneo, que se encuentra sometido a muchos tipos de estrés, tanto abiótico como biótico. En este mismo estudio se han encontrado un porcentaje muy elevado de ESTs relacionados con proteínas implicadas en procesos de defensa frente a patógenos y respuesta a estrés abiótico en la genoteca del estadio C3, en el que ha aparecido un porcentaje algo mayor de retrotransposones que están siendo expresados. Por lo tanto, la expresión de algunos de estos retrotransposones podría estar causada por las condiciones ambientales que envuelven al cormo.

La importancia de los elementos transponibles radica en que, merced a su capacidad de moverse dentro y entre cromosomas, pueden actuar regulando la expresión génica (White y col., 1994), incluyendo silenciamiento de genes o sobreexpresión, siendo una fuente de variación genética (Kidwell y Lisch, 1997). El azafrán es una especie estéril, por lo que carece de una fuente de variación genómica fundamental, como es la recombinación homóloga. En este tipo de especies, los elementos transponibles pueden jugar un papel fundamental, proporcionando la variación necesaria para la adaptación a condiciones cambiantes.

3.2.3.- Síntesis proteica, ensamblaje y degradación

En esta categoría se incluyeron todas aquellas secuencias que mostraron similitud con proteínas que participan en el proceso de síntesis y degradación proteica (tabla 3.5), incluyendo aquellas que intervienen en el plegado de proteínas y en el direccionamiento y transporte hacia su lugar dentro de la célula.

TABLA 3.5.- Resumen de ESTs con similitud con proteínas incluidas en la categoría de síntesis proteica, ensamblaje y degradación. n: número de ESTs. Id putativa: identificación putativa en función de las similitudes encontradas

C3		C4	
n	Id putativa	n	Id putativa
Síntesis proteica			
32	Proteínas ribosómicas	2	Proteínas ribosómicas
6	Factores de traducción	1	ARN polimerasa
2	Otras	2	PoliA polimerasa
		2	Espliceosomas
		1	Otras
Plegado			
8	Chaperoninas	1	Chaperonina
1	Complejo asociado a polipéptido naciente	2	Complejo asociado a polipéptido naciente
1	Proteína disulfuro isomerasa		
2	Ciclofilina		
Direccionamiento y transporte			
1	Transporte hacia el núcleo		
4	Transporte al retículo endoplásmico		
1	Transporte hacia vacuolas líticas		
Degradación			
9	Proteasas	2	Proteasas
3	Ubiquitina		
1	Proteína de conjugación a ubiquitina	1	Proteína de conjugación a ubiquitina

Síntesis proteica

La síntesis proteica es un proceso central en el crecimiento celular, la diferenciación y el crecimiento, ya que éstas constituyen un alto porcentaje de la célula de la planta y llevan a cabo muchas funciones celulares (Spremulli, 2000). En la categoría de síntesis proteica se han incluido todas aquellas proteínas que intervienen en este proceso, desde la transcripción de ARNm, de la que se ha encontrado una ARN polimerasa o una poliA polimerasa, pasando por la formación de los ribosomas, en los que intervienen diversas proteínas ribosómicas, hasta

el proceso de traducción, en la que intervienen factores de iniciación de la traducción o de elongación.

En la genoteca del cormo en estadio C3 se han encontrado 32 secuencias que mostraron similitud con proteínas ribosómicas², de las cuales 23 fueron diferentes, mientras que en el cormo en estadio C4 únicamente se encontraron 2³, una de las cuales está presente en ambos estadios.

En el cormo en estadio C3 además se han encontrado secuencias con similitud a proteínas que actúan como factores de iniciación y elongación de la traducción. En concreto, cinco de los clones secuenciados mostraron similitud con el factor de iniciación de la traducción eIF1⁴, que facilita la formación del complejo de los ribosomas y el resto de factores de iniciación. También se encontró una secuencia con similitud a un factor de elongación de la traducción⁵. Estas proteínas son necesarias para promover la unión del ARN de transferencia cargado al sitio A de la subunidad grande del ribosoma, mediante la formación de un complejo ternario con el propio ARNt y GTP.

En el cormo en estadio C4, se han encontrado otras secuencias con similitud con proteínas implicadas en el proceso de síntesis proteica, concretamente en el proceso de transcripción, como son una políA polimerasa⁶ y una ARN polimerasa de cloroplastos⁷. Además se han encontrado secuencias con similitud a ribonucleoproteínas integrantes de los espliceosomas⁸, implicados en la maduración del ARNm (Simpson y col., 1995; Boudonck y col., 1998; Domon y col., 1998).

² BM005552, BM005564, BM005546, BM005549, BM005541, BM005559, BM005566, BM005544, BM005565, BM005562, BM005558, BM005560, BM005554, BM005555, BM005540, BM005551, BM005556, BM005563, BM005548, BM005561, BM005553, BM005547, BM005545

³ BM956300, CB250229

⁴ CB250219

⁵ BM005539

⁶ BM956290

⁷ BM956299

⁸ BM956467, BM956298

Plegado

Aunque muchas proteínas pueden adoptar su forma correcta y biológicamente activa espontáneamente, este proceso en general necesita los requerimientos de otra serie de proteínas entre las que se incluyen las chaperonas moleculares (Fink, 1999).

Las condiciones de estrés incrementan las necesidades de la función de las chaperonas con el fin de evitar agregados y volver a plegar los polipéptidos desnaturalizados por las condiciones estresantes, por lo que las chaperonas suelen estar inducidas por temperaturas elevadas u otros tipos de estrés abiótico (Becker y Craig, 1994). Las condiciones de estrés a las que se encuentra sometido el cormo de azafrán pueden estar induciendo la expresión de chaperonas moleculares y otras proteínas que participan en el proceso de plegado. En total, en el cormo de azafrán en estadio C3 se han encontrado 12 ESTs que mostraron similitud con este tipo de proteínas, lo cual representa alrededor de un 2,5 % del total de secuencias analizadas. En el estadio C4 únicamente se encontraron 3 secuencias con similitud con este tipo de proteínas (de las cuales una también se está expresando en C3), que apenas representan un 1,5 % del total de secuencias estudiadas en este estadio.

Entre las secuencias encontradas, se ha encontrado similitud con proteínas de choque térmico del tipo Hsp70⁹ (Fink, 1999). Estas proteínas se encuentran localizadas en el citosol, el retículo endoplásmico, las mitocondrias, los plástidos y los peroxisomas, y la característica de la mayoría de estos genes es su fuerte inducción en respuesta a las altas temperaturas. Sin embargo, en algunas plantas se encuentran también inducidas por temperaturas bajas, aunque esta inducción está restringida a las chaperonas mitocondriales y citosólicas (Guy y Li, 1998; Li y col., 1999; Sung y col., 2001). Este puede ser el caso de las chaperonas encontradas en el cormo de azafrán en el mes de febrero.

⁹ BM005617

Se han encontrado tres secuencias que mostraron similitud con un homólogo de la chaperona del tipo DnaJ¹⁰ que regula la actividad ATPasa de las Hsp70 en los procesos de plegado, ensamblaje y desensamblaje de complejos proteicos (Diefenbach y Kindl, 2000; Houry, 2001; Kim y col., 2002b), y de las que se ha encontrado un alto nivel de expresión en cotiledones, donde ocurre una activa degradación de proteínas de reserva (Frugis y col., 1999).

Además, en el cormo en estadio C3, se están expresando genes que codifican otras proteínas que intervienen en el correcto plegado de las proteínas, como son la disulfuro isomerasa¹¹ (Cai y col., 1994; Puig y col., 1997), una proteína residente del retículo endoplásmico que cataliza la formación de puentes disulfuro en los polipéptidos y corrige los posibles errores cuando ocurren (Boston y col., 1996; Gilbert, 1997), y dos clones con similitud con ciclofilina¹², que presenta actividad peptidil-prolil cis-trans isomerasa y facilita los puentes proteicos en los que intervienen residuos de prolina (Gasser y col., 1990), además de favorecer la actividad como chaperona de la disulfuro isomerasa (Horibe y col., 2002).

En el estadio C4 se encontraron dos secuencias con similitud con proteínas de unión al polipéptido naciente¹³, una de las cuales se encontró en ambos estadios, y una chaperona de la familia Hsp70¹⁴.

Direccionamiento y transporte

Únicamente en el estadio C3 se han encontrado secuencias con similitud con proteínas implicadas en el proceso del transporte de polipéptidos. Concretamente una secuencia mostró similitud con la subunidad gamma de Sec61¹⁵ (Jungnickel y col., 1994; Beckmann y col., 1997; Römisch, 1999), que dirige al polipéptido naciente a través de la membrana del retículo endoplásmico. El complejo Sec61 es un

¹⁰ BM005621

¹¹ BM005557

¹² BM005597, BM005601

¹³ CB250230, BM956301

¹⁴ CB250231

¹⁵ BM005542

heterotrímero formado por tres subunidades: α , β y γ (Greenfield y High, 1999) ambas de pequeño tamaño, lo cual ha permitido obtener la secuencia completa de la subunidad gamma de azafrán, con una longitud de 69 aminoácidos y muy similar a la secuencia hallada en otras especies vegetales (figura 3.4), con una similitud del 97 % con la misma proteína de arroz.

Subunidad gamma de Sec61

Crosa	MDAIDSVVDPLREFAKDSVRLVKRCHKPDRKEFTKVAHRTAIGFVVMGFVGFFVKLIFIPINNIIVGSG
Orysa	MDAIDSVVDPLREFAKDSVRLVKRCHKPDRKEFTKVAHRTAIGFVVMGFVGFFVKLIFIPINNIIVGSG
Arath	MDAIDSVVDPLREFAKDSVRLVKRCHKPDRKEFTKVAHRTAIGFVVMGFVGFFVKLIFIPINNIIVGAT
Glyma	MDAIDSVVDPLREFAKDSVRLVKRCHKPDRKEFTKVAHRTAIGFVVMGFVGFFVKLIFIPINNIIVGSG

FIGURA 3.4.- Alineamiento de la secuencia de la subunidad gamma del complejo Sec61. Crosa: *Crocus sativus*, Orysa: *Oryza sativa*, Arath: *Arabidopsis thaliana*, Glyma: *Glycine max*.

Además, en el estadio C3 se han encontrado proteínas que intervienen en otros procesos de transporte de proteínas, concretamente un homólogo al receptor vacuolar BP-80¹⁶ (Kirsch y col., 1994; Paris y col., 1997), proteínas presentes únicamente en plantas y que interviene en el direccionamiento de proteínas hacia las vacuolas líticas por medio de vesículas de clatrina (Paris y col., 1997; Jiang y Rogers, 1998). Este proceso puede ser importante en el cormo de azafrán en crecimiento, por la necesidad de aminoácidos para la formación de nuevas estructuras.

También se han encontrado proteínas que participan en el transporte de proteínas hacia el núcleo a través de poros nucleares, como la GTPasa Ran/TC4¹⁷ (Lounsbury y col., 1996; Paschal y col., 1997). Además de esta función, las GTPasas de la familia Ran se han encontrado asociadas a otros procesos tales como el ensamblaje nuclear y la replicación del ADN (Hughes y col., 1998).

¹⁶ BM005543

¹⁷ BM005574

Degradación

La proteólisis es un proceso fundamental para el correcto funcionamiento de los organismos multicelulares, y juega un papel clave en procesos como el desarrollo, la fisiología, las respuestas de defensa y estrés o la adaptación al ambiente cambiante. La degradación de las proteínas celulares es un proceso continuo y constante, mediante el cual se destruyen proteínas anormales, se reciclan aminoácidos y se eliminan moléculas no necesarias. Las proteínas anormales son el resultado de mutaciones, errores en la síntesis o el plegado, desnaturalización espontánea, enfermedades, estrés o daño oxidativo. Estas proteínas deben ser eliminadas por el peligro de ocasionar daños a la propia célula, pues pueden formar grandes agregados insolubles. Una de las principales vías en la proteólisis es el sistema ubiquitina-proteosomas, mediante el cual, las proteínas que tienen que ser eliminadas son marcadas mediante la ubiquitina y dirigidas hacia los proteosomas, donde son hidrolizadas por la acción de diversas clases de proteasas. En los dos estadios (C3 y C4) se han encontrado secuencias con similitud con ubiquitina o de conjugación a ubiquitina¹⁸, por lo que el proceso de degradación proteica es activo en ambas fases.

Cada orgánulo tiene sus propias vías de degradación de proteínas. Por ejemplo, en el estadio C3 se han encontrado secuencias con similitud a aspartato proteasas¹⁹ o cisteína proteasas²⁰, que pueden estar presentes en vacuolas o cuerpos proteicos para la degradación de proteínas de reserva presentes en estos orgánulos.

También se ha encontrado una secuencia con similitud con una probable Clp proteinasa de *Arabidopsis*²¹, de las que la mayor parte de isómeros se han encontrado localizadas en cloroplastos (Sokolenko y col., 1998; Adam y col., 2001; Zheng y col., 2002). Estas proteínas se han encontrado asociadas a un correcto desarrollo de los cloroplastos (Shikanai y col., 2001), con un mayor nivel de expresión en hojas que

¹⁸ BM005691, BM005692, BM005694, BM005695, BM956328

¹⁹ BM005677

²⁰ BM005672

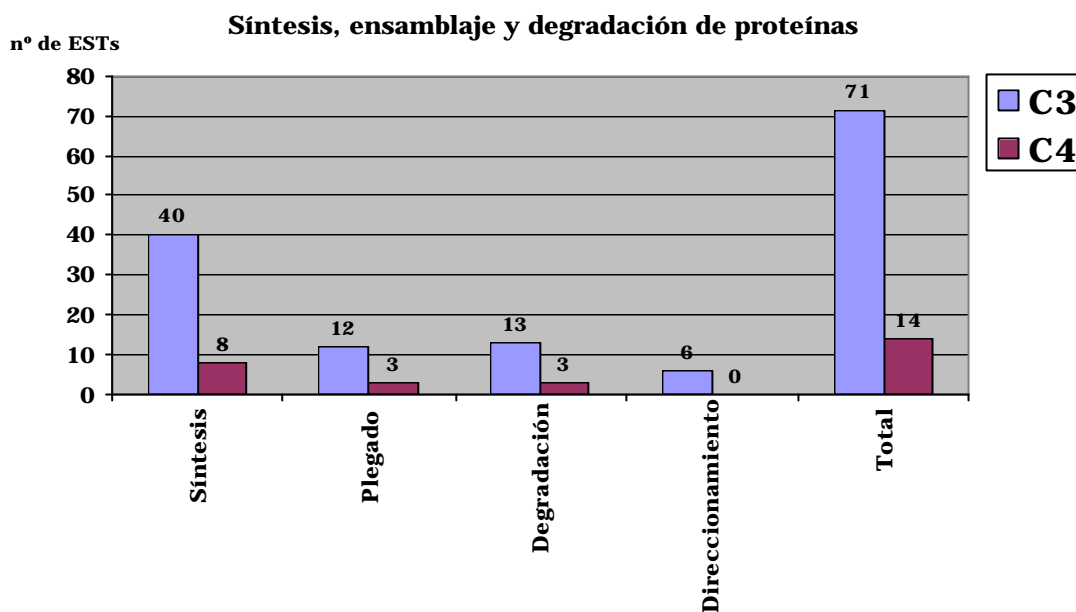
²¹ BM005550

en el resto de órganos. No están inducidas por condiciones de estrés en plantas superiores, por lo que se piensa que pueden estar envueltas en la respuesta de las plantas a diferentes condiciones fisiológicas (Zheng y col., 2002).

También se ha encontrado una secuencia con similitud a proteasas similares a subtilisina²². Éstas son del tipo de las serina proteasas, ampliamente distribuidas en los organismos vivos. La familia de proteasas similares a subtilisina ha mostrado una expresión diferencial en diferentes estadios de desarrollo de la planta, por lo que se piensa que ciertas proteínas componentes de esta familia pueden estar envueltas en procesos proteolíticos que suceden durante el desarrollo (Jordá y col., 1999). Además, esta familia de proteasas se ha encontrado asociada a procesos tales como la respuesta hipersensible de las plantas frente al ataque de patógenos (Jordá y col., 1999, 2000; Jordá y Vera, 2000), la regulación de la densidad y distribución de los estomas (Berger y Altmann, 2000), o la formación de la cutícula (Tanaka y col., 2001). En el caso del cormo de azafrán, estas proteasas podrían participar en procesos de defensa frente a los patógenos presentes en el suelo.

²² BM005681

A



B

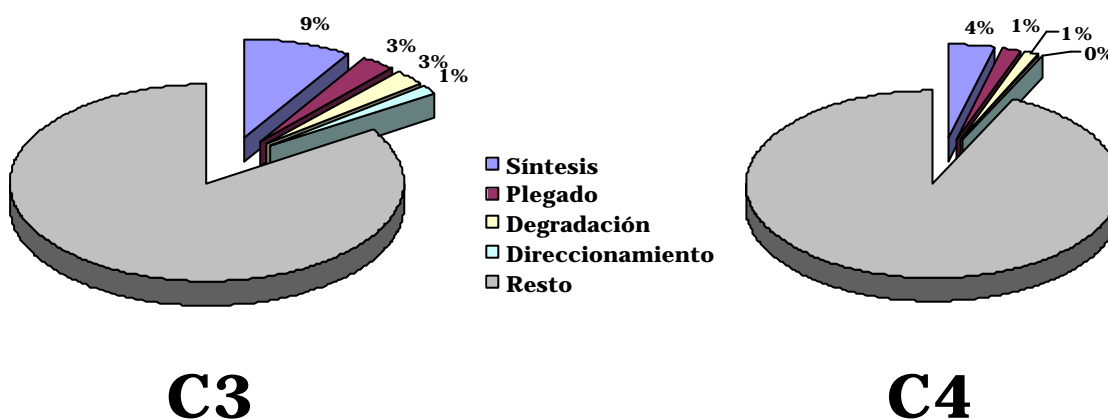


FIGURA 3.5.- A) Comparación del número de ESTs que mostraron similitud con proteínas implicadas en procesos de síntesis, plegado y degradación de proteínas entre los dos estadios. B) Porcentaje de ESTs asignado a cada categoría con respecto al total de clones secuenciados. El resto hace referencia a los ESTs no incluidos en la categoría de síntesis, ensamblaje y degradación de proteínas.

En conjunto se aprecia una gran diferencia en el nivel de expresión de proteínas implicadas en procesos de síntesis, plegado y degradación de proteínas entre los dos estadios analizados (figura 3.5). En el estadio C3 los niveles son mayores en todas los procesos, llegando en conjunto a sumar un 16 % de los clones totales, indicando una gran actividad

metabólica en este estadio, en el que se produce el crecimiento del cormo. Sin embargo, durante el estadio C4 la actividad se ralentiza, entrando en un periodo de dormancia, como lo evidencia la aparición de únicamente un 7 % de los clones de la genoteca de C4 en esta categoría. La diferencia entre ambos estadios es muy grande en las proteínas ribosómicas, que indica una mayor actividad de síntesis proteica en C3. Pero también es mayor el porcentaje de chaperoninas y de enzimas proteolíticas. La expresión de las primeras puede estar incrementada por las condiciones de estrés del cormo, pues en este mismo estudio en el estadio C3 también se han encontrado un mayor número de secuencias asociadas a defensa frente a patógenos y estrés. Por otro lado, las proteasas pueden jugar un papel importante en la recuperación de aminoácidos para la formación de las nuevas estructuras del cormo en crecimiento.

3.2.4.- Transporte

Los transportadores del citoplasma y las membranas intracelulares son los responsables de la adquisición, redistribución y compartimentación de los nutrientes orgánicos y los iones inorgánicos, así como de la expulsión de compuestos tóxicos y los productos finales del metabolismo, la transducción de señales y energía y la generación de turgencia.

La asimilación del nitrato por las células de las plantas requiere el transporte del nitrato a través de la membrana plasmática y su posterior reducción a amoníaco. En el cormo en estadio C3 se ha encontrado una secuencia con similitud con un transportador de nitratos de la clase NRT1²³ (Galván y Fernández, 2001; Orsel y col., 2002). Además, en el cormo en estadio C3 se han encontrado 3 secuencias diferentes que muestran similitud con transportadores de cationes²⁴.

²³ BM005572

²⁴ BM005568, BM005569, BM005569

En el cormo en estadio C4 se han encontrado, además de una secuencia con similitud con una proteína transportadora de cationes²⁷, dos secuencias con similitud con canales de agua o aquaporinas²⁸. Estas proteínas son abundantes en las membranas plasmática y vacuolar, donde facilitan y regulan la infiltración de agua (Baiges y col., 2002). En general, las aquaporinas son un grupo muy heterogéneo de proteínas que se sintetizan en respuesta a diversas condiciones de estrés y del desarrollo (Maurel y col., 2002), en concreto, su presencia puede ser necesaria para facilitar un intenso flujo de agua en condiciones de estrés o deficiencia de nutrientes (Javot y Maurel, 2002). Su aparición en el cormo en el mes de julio, en el que las condiciones ambientales se caracterizan por un estrés hídrico elevado, no es extraña.

En el estadio C4 además se encontró una secuencia que mostró similitud con una proteína integral de membrana de la familia v-SNARE²⁹, implicada en el tráfico de vesículas en la ruta de secreción. Estas proteínas participan en el proceso de fusión de vesículas que transportan proteínas hacia sus destinos intra o extracelulares (Sanderfoot y Raikhel, 1999; Zheng y col., 1999). Este es el camino seguido por las proteínas de reserva, que como se verá más adelante, presentan su máximo nivel de expresión en el estadio C4, y son transportadas hacia vacuolas de reserva para su almacenamiento. Además, en este estadio se encontró otra secuencia con similitud con una proteína de unión a oxisterol³⁰, que también se han encontrado asociadas a procesos de regulación del transporte de vesículas (Xu y col., 2001; Wyles y col., 2002).

Se ha encontrado un porcentaje mayor de secuencias relacionadas con transportadores en el estadio C4 (tabla 3.6). Concretamente un 6 % de las secuencias obtenidas en C4 mostraron similitud con proteínas implicadas en procesos de transporte, mientras que en C3 este

²⁷ CB250233

²⁸ BM956302, BM956303

²⁹ BM956329

³⁰ BM956316

porcentaje representó un 2,4 %. La importancia del transporte en el cormo en estadio C4 es por lo tanto mayor, realizándose la distribución de los compuestos celulares hacia sus compartimentos.

TABLA 3.6.- Resumen de ESTs con similitud con proteínas incluidas en la categoría de transporte. n: número de ESTs. Id putativa: identificación putativa en función de las similitudes encontradas

C3		C4	
n	Id putativa	n	Id putativa
1	Aquaporina	2	Aquaporinas
4	Transportador de cationes	1	Transportador de cationes
4	Pirofosfatasas	1	Pirofosfatasas
1	ATPasa tipo V	1	Sinaptobrevina (v-SNARE)
1	Transportador de nitrato	1	Proteína de unión a oxisterol
		1	Transportador de aa
		5	Proteínas transportadoras

3.2.5.- Organización celular

Proteínas modificadoras de la pared celular

Las células vegetales difieren de las animales en varios rasgos, entre los que se encuentra la presencia de una matriz extracelular rígida rica en polisacáridos: la pared celular, de la que depende en gran medida la forma de la célula vegetal. En el presente estudio, en el cormo en estadio C3 se han encontrado secuencias que mostraron similitud con proteínas modificadoras de los polisacáridos de la pared celular, como es el caso de la pectina metilesterasa³¹, que elimina los grupos metilo de los homogalacturonanos componentes de las pectinas, permitiendo así la unión entre cadenas antiparalelas (Carpita y McCann, 2000).

La actividad de la pectina metilesterasa juega un papel fundamental en el crecimiento y desarrollo, por el efecto de la disminución de pH que se produce mediante la liberación de un protón cuando los grupos metilo son convertidos en grupos carboxilo. Este pH bajo es necesario para la correcta elongación celular, por lo que la inactivación de la pectina

³¹ BM005581, BM005586

metilesterasa puede provocar deformaciones de la célula y una elongación reducida (Wen y col., 1999).

En el estadio C4 aparecieron otro tipo de proteínas modificadoras de la pared celular, concretamente una secuencia que mostró similitud con la lacasa³². Las lacasas o polifenol oxidasas se encuentran comúnmente en hongos (Leonowicz y col., 2001; Burke y Cairney, 2002), aunque también han sido descritas en menor medida en plantas superiores. En las plantas leñosas están implicadas en la síntesis de la lignina, una matriz de polímeros de polifenoles (McDougall, 2000; Richardson y col., 2000). Su polimeración se ve favorecida por la creación de radicales debida a la oxidación de los fenoles llevada a cabo por las lacasas. Esta capacidad de creación de radicales se ha empleado en la industria, para la obtención de materiales adhesivos o copolímeros de lignina y materiales acrílicos (Huttermann y col., 2001). Incluso se puede emplear en procesos de biorremediación de vertidos industriales (Mayer y Staples, 2002). En la planta, además de la creación de lignina, se piensa que pueden estar implicadas en la defensa frente a patógenos (Li y Steffens, 2002), en el metabolismo de fenoles y en la correcta formación de la estructura de la pared celular (Ranocha y col., 2002). Su función en el corno, en el estadio C4 en el mes de julio puede estar relacionada con la protección frente a condiciones climáticas desfavorables, con temperaturas elevadas y precipitaciones escasas.

Por lo tanto, hemos apreciado diferencias en este tipo de proteínas en los dos estadios del corno de azafrán estudiados. En el estadio C3, durante el crecimiento del corno, han aparecido ESTs con similitud con proteínas que intervienen en la formación y crecimiento de la pared, necesarias para una correcta elongación celular, mientras que en el estadio C4 se ha detectado la expresión del gen de una proteína relacionada con la lignificación y defensa frente a patógenos.

³² BM956313

Proteínas integrantes de la pared celular

Aunque el principal almacén de la pared está compuesto por polisacáridos, existen ciertas proteínas estructurales que pueden formar parte de ella, en estructuras independientes que interactúan con los polisacáridos. Entre éstas se encuentran las glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs), las proteínas ricas en prolina (PRPs) y las proteínas ricas en glicina (GRPs). Al primer tipo pertenecen las extensinas, las proteínas más estudiadas de este grupo, y que se encuentran codificadas por un familia génica con expresión diferencial (Yoshida y col., 2001). Su función puede ser mayor que simplemente estructural, pues se ha asociado a resistencia a estrés oxidativo (Wisniewski y col., 1999), o a enfermedades o heridas (Nebel y col., 1993; Ahn y col., 1996; El-Gendy y col., 2001; Jackson y col., 2001), respondiendo a señales defensivas como puede ser el ácido salicílico, ácido abscísico o metil jasmonato (Merkouropoulos y col., 1999). Además, las extensinas se han encontrado en tejidos en desarrollo (Neale y col., 1990; Sturaro y col., 1998; Baumberger y col., 2001). En el cormo en estadio C3 se encontró una secuencia con similitud con un homólogo de extensina³³. Además, en ambos estadios aparecieron secuencias con similitud con PRPs³⁴, que pueden estar formando parte del entramado proteico de la pared celular.

Proteínas de relajamiento de la pared

Uno de los principales determinantes de la expansión celular es el relajamiento de la pared celular. Este relajamiento debe estar integrado con la deposición de nuevos materiales en la pared, permitiendo el crecimiento celular a la vez que se mantiene un espesor constante de la misma. En la actualidad se están estudiando dos enzimas como posibles causantes del relajamiento de la pared: la xiloglucano endotransglucosilasa y la expansina (Carpita y McCann, 2000), ambas presentes en los ESTs procedentes del estadio C3. La primera, la

³³ BM005583

³⁴ BM005588, BM005590, BM956314, BM956315

xiloglucano endotransglicosilasa³⁵, cataliza una transglicosilación en la que una cadena de xiloglucanos es cortada y reinsertada en el extremo no reductor de otra cadena de xiloglucanos. Asimismo, puede funcionar en la reordenación de nuevo material en diferentes estratos durante el crecimiento. Las otras enzimas, las expansinas³⁶, catalizan la rotura de puentes de hidrógeno entre la celulosa y los glicanos que llevan unidos. Las expansinas son las únicas enzimas que han producido expansión de la pared *in vitro*, y están envueltas en la elongación celular (Caderas y col., 2000). Por ello son comunes en los tejidos en crecimiento de las plantas con flores, donde desempeñan un importante papel en su desarrollo, incluyendo el control del tamaño del órgano, su morfología o la abscisión en el caso de las hojas (Cho y Cosgrove, 2000). Ambas proteínas se han encontrado en el cormo en estadio C3, momento en el que se produce el máximo engrosamiento del cormo. En el estadio C4 se encontró un clon de expansina³⁷.

Proteínas del citoesqueleto y de organización de estructuras celulares

El citoesqueleto de actina es una estructura compleja y dinámica que participa en diversos eventos celulares, que contribuyen a la morfogénesis y el desarrollo de las plantas (McCurdy y col., 2001), incluyendo la polaridad celular, la elongación celular o la deposición de la pared celular mediante vesículas asociadas a los filamentos de actina. Además, interacciona con los distintos orgánulos para moverlos específicamente o anclarlos en posiciones definidas. La organización supramolecular y la función del citoesqueleto está regulada por ciertas proteínas que se unen a actina. Entre éstas se encuentra la profilina, con la cual se ha encontrado similitud en cinco clones de la genoteca de C3³⁸. Es una proteína ubicua en los organismos eucariotas, que se une a monómeros de actina y que está envuelta en la organización del citoesqueleto de eucariotas (Ramachandran y col., 2000). Varios

³⁵ BM005587

³⁶ BM005585

³⁷ BM956312

³⁸ BM005584

procesos celulares relacionados con el crecimiento dependen de la rápida reorganización de la red dinámica que conforman los elementos de actina del citoesqueleto, por lo que la profilina se ha encontrado activa en células en crecimiento, como los granos de polen en germinación o los pelos radicales (Swoboda y col., 2001). La carencia de ciertas isovariantes de profilina puede ocasionar alteraciones en la germinación de las semillas, con un desarrollo más lento y una elongación excesiva del hipocotilo (McKinney y col., 2001). En *Arabidopsis* se ha descrito que la profilina está codificada por una familia génica con cinco variantes, tres de las cuales son constitutivas y su expresión es grande en todos los tejidos vegetativos en diferentes estadios de desarrollo, mientras que las otras dos son específicas de polen (Kandasamy y col., 2002).

En el estadio C3 se han encontrado además secuencias con similitud con otras proteínas que intervienen en la organización nuclear, como son las láminas³⁹. Éstas son los constituyentes principales de la lámina nuclear, una capa proteica situada entre la cromatina y la membrana interna nuclear, manteniendo la forma de este orgánulo y permitiendo su máxima actividad al final de la profase. Pero no solo tienen actividad estructural, pues bien solas o interactuando con otras proteínas nucleares, intervienen en procesos celulares como el ensamblaje de la envoltura nuclear, la replicación del ADN, la transcripción o la apoptosis (Goldman y col., 2002). La lámina nuclear es característica de las células animales de vertebrados e invertebrados, pero se han descrito estructuras similares en células de vegetales superiores (McNulty y Saunders, 1992; Mínguez y Moreno Díaz de la Espina, 1993; Masuda y col., 1997). Esta estructura se desmonta y se vuelve a ensamblar en paralelo con la desintegración y la formación de la envoltura nuclear durante la mitosis (Masuda y col., 1999).

También se ha encontrado una secuencia con similitud a un factor de ribosilación de ADP⁴⁰. Éstas son pequeñas proteínas que se unen a GTP

³⁹ BM005582

⁴⁰ BM005589

y que presentan funciones relacionadas con la regulación de la estructura de las membranas, variando su composición de lípidos o remodelando la actina asociada a varios compartimentos celulares (Donaldson, 2000), y participan también en procesos de tráfico intracelular de proteínas (Lee y col., 2002).

A pesar de que el porcentaje de ESTs relacionados con organización celular es similar en ambos estadíos (4,0 % en C3 y 3,5 % en C4), las funciones en las que están envueltos son diferentes (tabla 3.7). En el estadío C3 se han encontrado secuencias relacionadas con proteínas modificadoras de la pared y proteínas de relajación de la pared, que indica que durante este periodo se está produciendo crecimiento celular, favorecido por la relajación de su pared y adición de nuevos compuestos polisacáridos. Este hecho se ve apoyado por la aparición de ESTs con similitud con proteínas del citoesqueleto en el estadío C3, que pueden estar envueltas en procesos de crecimiento y desarrollo celular. En C4, por el contrario apareció una secuencia envuelta en procesos de lignificación, que probablemente contribuyen a la defensa del cormo frente a condiciones adversas causadas por la escasez de agua.

TABLA 3.7.- Resumen de ESTs con similitud con proteínas incluidas en la categoría de organización celular. n: número de ESTs. Id putativa: identificación putativa en función de las similitudes encontradas

C3		C4	
n	Id putativa	n	Id putativa
Proteínas modificadoras de la pared celular			
4	Pectin metilesterasa	1	Lacasa
Proteínas integrantes de la pared celular			
1	Homólogo de extensina		
3	Proteína rica en prolina	2	Proteína rica en prolina
Proteínas de relajación de la pared celular			
1	Expansina	1	Expansina
1	Xiloglucano endotransglucosilasa		
Proteínas del citoesqueleto			
5	Profilina	2	Colágeno
2	Lamina nuclear		
1	Factor de ribosilación de ADP		

3.2.6.- Regulación génica y desarrollo

La regulación del desarrollo es un proceso complejo, en el que intervienen jerarquías de factores de transcripción que regulan los procesos de formación de los tejidos (*The Arabidopsis Genome Initiative*, 2000). Tanto en el estadio C3, durante el mes de febrero en el que tiene lugar el mayor engrosamiento del cormo, como en el estadio C4 durante la dormancia, se han encontrado secuencias con similitud con proteínas implicadas en procesos del desarrollo (tabla 3.8).

TABLA 3.8.- Identificación putativa de los ESTs asignados a la categoría del desarrollo y proceso en los que están implicados.

Id. putativa	Proceso del desarrollo
C3	
Proteína relacionada con apoptosis	Muerte celular programada
SRG1	Senescencia y muerte celular programada
SCARECROW	Formación del patrón radial de raíces y tallos
B12D	Maduración y germinación de la semilla
Tousled quinasa	Desarrollo floral
WD-40	Múltiples funciones celulares
Proteína regulada por auxinas	División celular
TCTP	Crecimiento
C4	
Proteína de embriogénesis somática	Embriogénesis somática
YABBY 2	Asimetría abaxial de órganos laterales

En el estadio C3 se ha encontrado una secuencia con similitud con el factor de transcripción SCARECROW⁴¹ (SCR), que se expresa en células meristemáticas y está implicado en procesos de organización radial, durante la embriogénesis y el periodo postembrionario (Di Laurenzio y col., 1996; Wysocka-Diller y col., 2000; Sassa y col., 2001). Esta proteína pertenece a la denominada familia GRAS junto con otros genes

⁴¹ BM005575

de regulación de giberelinas, y únicamente se ha encontrado en plantas superiores (Pysh y col., 1999). Una función similar de división asimétrica se ha descrito para la proteína disulfuro isomerasa en embriones animales (Hoshijima y col., 2002), de la que también se ha encontrado una secuencia con similitud. El cormo en estadio C3 se encuentra en crecimiento, por lo que no extraña la expresión de este tipo de factores de transcripción, implicados en la organización tisular.

Entre las secuencias que mostraron similitud con proteínas implicadas en procesos del desarrollo que aparecieron en la secuenciación de clones de la genoteca de C3, cabe mencionar una proteína relacionada con apoptosis⁴². Este proceso de muerte celular programada es una parte esencial en el crecimiento y desarrollo de muchos organismos eucariotas (Dangl y col., 2000). Otra secuencia mostró similitud con una quinasa similar a tousled⁴³ (TSL), que se ha encontrado asociada al desarrollo floral (Roe y col., 1997). En el mes de febrero, en el que se recogieron los cormos para la realización de la genoteca de C3, la floración hace cuatro meses que ha ocurrido, luego esta quinasa debe realizar otra función celular. Se ha sugerido que puede estar realizando la función de fosforilación de la histona H3 (Li y col., 2001) y que puede tener un importante papel en la replicación continuada del ADN durante la fase S del ciclo celular (Silljé y col., 1999).

Otra secuencia mostró similitud con una proteína de tumor controlada traduccionalmente⁴⁴ (TCTP). Estas proteínas son ubicuas entre los eucariotas (Pay y col., 1992; Thiele y col., 2000), si bien un primer análisis de los alineamientos de las secuencias halladas en las bases de datos permite apreciar claras diferencias entre los reinos animal y vegetal (figura 3.7). Su grado de conservación hace suponer que presentan importantes funciones celulares (Sanchez y col., 1997). Aunque su función se desconoce, se ha visto que presentan sitios de unión a Ca^{2+} (Kim y col., 2000) y que presentan la capacidad de unirse y estabilizar microtúbulos del citoesqueleto (Yarm, 2002).

⁴² BM005591

⁴³ BM005598

⁴⁴ BM005602



B

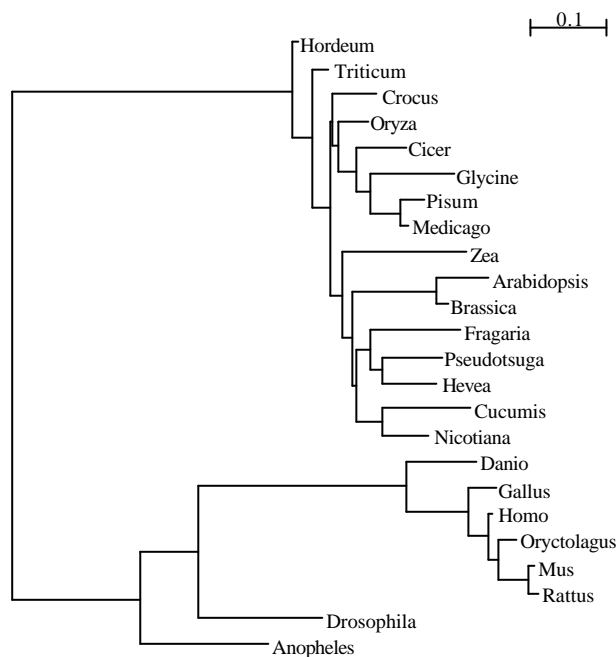


FIGURA 3.7.- A) Alineamientos del extremo carboxilo terminal de las secuencias de TCTP. B) Relaciones filogenéticas obtenidas a partir de los alineamientos de A.

Además, se han encontrado otras secuencias que mostraron similitud con proteínas que, aunque no se conoce su función, se están

expresando en momentos concretos del desarrollo. Entre éstas se encuentran una proteína similar a SRG1⁴⁵ de *Arabidopsis*, que se expresa en órganos senescentes y en cultivos celulares en las últimas fases del ciclo, seguida de una inmediata pérdida de viabilidad celular (Callard y col., 1996). También se ha encontrado un análogo de la proteína B12D⁴⁶, que se expresa principalmente durante la maduración de la semilla y la germinación (Aalen y col., 2001), aunque también se ha encontrado en tejido materno (Aalen y col., 1994) y en hojas senescentes de *Ipomoea batatas* (To y col., 1999). La acumulación de reservas en el cormo del azafrán puede ser un proceso similar a la maduración de las semillas, pues es éste el órgano responsable de la propagación del azafrán y el encargado de acumular las reservas necesarias para que se produzca la brotación.

Otra similitud interesante encontrada fue con una proteína con repeticiones WD-40⁴⁷. Estas proteínas, que únicamente se han encontrado en organismos eucariotas, se caracterizan por la presencia de secuencias repetidas altamente conservadas, que normalmente terminan con Asp-Trp (WD), y aparentemente no comparten propiedades funcionales (van der Voorn y Ploegh, 1992). Entre las funciones que desarrollan éste tipo de proteínas se encuentran funciones celulares cruciales, como la división celular, la determinación del destino celular, la transcripción, la señalización a través de membrana, la modificación del ARNm o la fusión de vesículas (Neer y col., 1994; García-Higuera y col., 1996; Smith y col., 1999), además de haberse encontrado en otros procesos del desarrollo como la regulación de factores de activación de proteasas apoptóticas (Adrain y col., 1999; Benedict y col. 2000). Otras secuencias mostraron similitud con proteínas reguladas por hormonas, en concreto una de ellas que también contiene repeticiones WD-40, regulada por auxinas⁴⁸ y que se ha sugerido que puede estar envuelta en procesos de división celular

⁴⁵ BM005593

⁴⁶ BM005592

⁴⁷ BM005603

⁴⁸ BM005690

(Ishida y col., 1993) y otra pequeña proteína de unión a GTP⁴⁹ que se ha encontrado asociada a la respuesta a etileno (Zegzouti y col., 1999).

En la genoteca de C4 se encontró una secuencia que mostró similitud con proteínas relacionadas con embriogénesis somática⁵⁰. Debido al hecho ya comentado de la esterilidad del azafrán, la formación de embriones somáticos puede resultar de gran importancia en la propagación de la planta, y pueden ser proteínas interesantes desde el punto de vista del estudio de la micropropagación de esta especie.

Una de las secuencias encontradas en la genoteca de C4 mostró similitud con una proteína de meristemo no apical⁵¹ (NAM), mostrándose muy conservada, hasta tal punto que ofreció un 100 % de similitud con su homólogo en *Arabidopsis*, en una secuencia de 97 aminoácidos (figura 3.8), siendo ésta la única similitud encontrada para esta secuencia. Este elevado grado de conservación, hace suponer que su función debe ser importante.

```
Query: 323 IQPHHFNSYQSI FNHQVFGSASGSTYNNNNEMIKMEQSLVSVSQETCLSSDVNANMTTTT 144
          IQPHHFNSYQSI FNHQVFGSASGSTYNNNNEMIKMEQSLVSVSQETCLSSDVNANMTTTT
Sbjct: 239 IQPHHFNSYQSI FNHQVFGSASGSTYNNNNEMIKMEQSLVSVSQETCLSSDVNANMTTTT 298

Query: 143 EVSSGPV MKQEMGMMGMVNGSKSYEDLCDLRGDLWDF 33
          EVSSGPV MKQEMGMMGMVNGSKSYEDLCDLRGDLWDF
Sbjct: 299 EVSSGPV MKQEMGMMGMVNGSKSYEDLCDLRGDLWDF 335
```

FIGURA 3.8.- Secuencia parcial de proteína de meristemo no apical. Query: secuencia de *Crocus sativus*. Sbjct: secuencia de *Arabidopsis thaliana*.

Otra secuencia mostró similitud con una proteína de la familia génica YABBY⁵², cuyos miembros se han encontrado asociados a procesos de asimetría abaxial de los órganos laterales producidos a partir del meristemo apical, expresándose de una manera polar en estos órganos (Siegfried y col., 1999; Eshed y col., 2001; Bowman, 2000). Además de esta función, se ha propuesto que en el desarrollo de estos órganos pueden actuar regulando negativamente genes homeobox, de tal forma

⁴⁹ BM005693

⁵⁰ BM956319

⁵¹ BM956306

⁵² BM956305

que el crecimiento e iniciación de meristemas se restrinja al ápice (Kumaran y col., 2002).

Además de éstas, se han encontrado secuencias con similitud con otros factores de transcripción como yippee⁵³ y con proteínas de unión a ADN⁵⁴.

En el azafrán en estadio C3 se han encontrado factores de transcripción implicados con procesos de crecimiento celular y morfogénesis, lo cual concuerda con lo encontrado en categorías anteriores, principalmente las de síntesis proteica y organización celular. Todo ello indica que en el cormo en este estadio, durante el mes de febrero en el que se produce el crecimiento máximo, la actividad metabólica es grande, y va acompañada de modificación y crecimiento de la pared celular y la expresión de factores de transcripción implicados en procesos de crecimiento celular. En el estadio C4, durante el mes de julio en el que el cormo permanece durmiente, también han aparecido factores de transcripción, si bien no están implicados en procesos de crecimiento celular, sino más bien en la formación de embriones somáticos y el establecimiento de asimetría abaxial. Podrían estar relacionados con la brotación, que se producirá en el mes siguiente, y la formación del nuevo cormo hijo en la superficie de los cormos maternos.

3.2.7.- Percepción y transducción de señales

Las plantas responden continuamente a señales como la luz, nutrientes minerales y metabolitos orgánicos, condiciones medioambientales, heridas y enfermedades, etc., que alteran su fisiología, morfología y desarrollo a lo largo del ciclo vital (figura 3.9). Dos de los elementos principales en la transducción de señales son el Ca²⁺ intracelular y las proteína quinasas (Trewavas, 2000).

⁵³ BM956310

⁵⁴ BM956307, BM956308

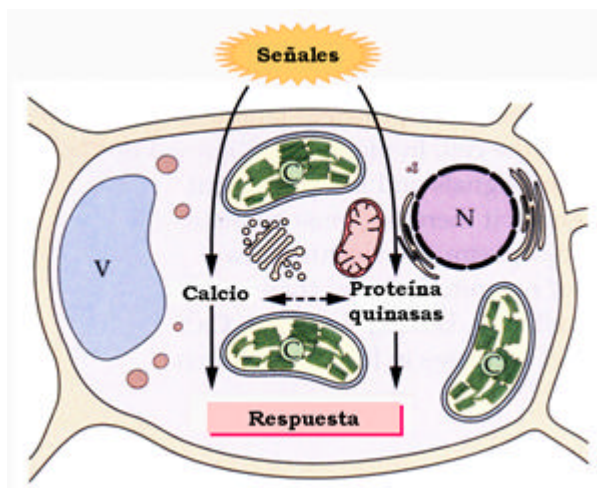


FIGURA 3.9.- Principales vías de transducción de señales (Trewavas, 2000).

La calmodulina, de la que se han encontrado dos secuencias diferentes en la genoteca del estadio C3⁵⁵, es un receptor primario de Ca^{2+} , pues el complejo Ca^{2+} -calmodulina puede activar otras muchas enzimas, interviniendo en muchos procesos celulares, incluyendo la tuberización en patata (Reddy y col., 2002). En este aspecto también se ha encontrado una secuencia con similitud con una quinasa del inositol trifosfato⁵⁶, que puede estar implicada en la creación de canales de Ca^{2+} .

En cuanto a la otra vía de respuesta a señales, se han detectado dos secuencias del estadio C3 que mostraron similitud con proteína quinazas⁵⁷, que pueden estar actuando en alguna vía de la transducción de señales. Además, se han incluido secuencias que mostraron similitud con proteína quinazas receptoras. En concreto, en el estadio C3 aparecieron 3 secuencias⁵⁸, mientras que en el estadio C4, apareció una sola⁵⁹.

En el estadio C3 además aparecieron secuencias que mostraron similitud con proteínas de la familia de reguladores de la señalización

⁵⁵ BM005613, BM005614

⁵⁶ BM005612

⁵⁷ BM005605, BM027771

⁵⁸ BM005606, BM005609, BM005611

⁵⁹ BM956320

14-3-3⁶⁰, que participan en múltiples vías reguladoras críticas reguladas por fosforilación (DeLille y col., 2001). Esta familia proteica se encuentra muy conservada (figura 3.10) y sus miembros pueden actuar como segundos mensajeros en procesos mediados por reguladores del crecimiento, concretamente por auxinas (Trewavas, 2000), hormona envuelta en procesos de crecimiento, maduración y diferenciación.

Glycine	QDIALADLAPTHPIRLGLALNFSVFYYEILNSPDRACNLAKQ
Triticum	QDIALADLAPTHPIRLGLALNFSVFYYEILNSPDRACNLAKQ
Hordeum	QDIALADLPPTHPIRLGLALNFSVFYYEILNSPDRACNLAKQ
Helianthus	QDIANAELAPTHPIRLGLALNFSVFYYEILNSPDRACNLAKQ
Spinacea	QDIANAELAPTHPIRLGLALNFSVFYYEILNSPDRACNLAKQ
Arabidopsis	QDIANAELAPTHPIRLGLALNFSVFYYEILNSPDRACNLAKQ
Nicotiana	QDIANAELAPTHPIRLGLALNFSVFYYEILNSPDRACNLAKQ
Pisum	QDIANAELPPTHPIRLGLALNFSVFYYEILNSPDRACNLAKQ
Cucurbita	QDIANAELPPTHPIRLGLALNFSVFYYEILNSPDRACSLAKQ
Picea	QDIAAAELAPTHPIRLGLALNFSVFYYEILNSPDRACNLAKQ
Zea	QDIALAELAPTHPIRLGLALNFSVFYYEILNSPDRACSLAKQ
Populus	QDIALSELAPTHPIRLGLALNFSVFYYEILNSPDRACSLAKQ
Mesembryanthemum	QDIALAELAPTHPIRLGLALNFSVFYYEILNSPDRACNLAKQ
Lycopersicon	QDIALAELAPTHPIRLGLALNFSVFYYEILNSPDRACNLAKQ
Fritillaria	QDIALAELAPTHPIRLGLALNFSVFYYEILNSPDRACNLAKQ
Lilium	QDIALAELAPTHPIRLGLALNFSVFYYEILNSPDRACNLAKQ
Solanum	QDIALAELTPTHPIRLGLALNFSVFYYEILNSPDRACNLAKQ
Crocus	QDIALAELTSTHPIRLGLALNFSVFYYEILNSPDRACNLAKQ
Oryza	QDIALAELPPTHPIRLGLALNFSVFYYEILNSPDRACNLAKQ
	**** : : . . ***** . ****

FIGURA 3.10.- Alineamientos de la secuencia parcial de la proteína 14-3-3 mostrando el alto grado de conservación entre los distintos géneros.

Se encontraron un mayor número de secuencias con similitud con proteínas implicadas en percepción y transducción de señales en la genoteca del estadio C3 (tabla 3.9). Esto concuerda con la mayor actividad del corno durante los meses de engorde, que puede estar respondiendo no sólo a señales ambientales, sino también a señales intracelulares implicadas en procesos de crecimiento celular y desarrollo. Además, existe relación con la aparición de secuencias

⁶⁰ BM005608

relacionadas con proteínas implicadas en procesos del desarrollo celular y el mayor porcentaje de secuencias con similitud con proteínas de defensa y respuesta a estrés que se han encontrado en el estadio C3, indicando unas duras condiciones ambientales a las que el cormo está respondiendo. En el estadio C4, únicamente apareció una secuencia en esta categoría, concretamente un receptor quinasa, confirmando el estado de dormancia y la ralentización de su actividad celular.

TABLA 3.9.- Resumen de las proteína implicadas en procesos de percepción y transducción de señales encontradas en cormo de azafrán.

Percepción y transducción de señales		
	Estadio C3	Estadio C4
Receptores de calcio	Calmodulina (5 clones)	
Proteína quinasas	Proteína quinasas (2 clones)	
Receptores	Receptor quinasa (3 clones)	Receptor quinasa (1 clon)
Reguladores	Proteínas 14-3-3 (2 clones)	

3.2.8.- Respuesta a patógenos y estrés

En esta categoría se han encontrado importantes diferencias entre los estadios C3 y C4. En el primero aparece un número mucho mayor de secuencias que mostraron similitud con proteínas implicadas en procesos de defensa frente a patógenos y de respuesta a estrés (figura 3.11).

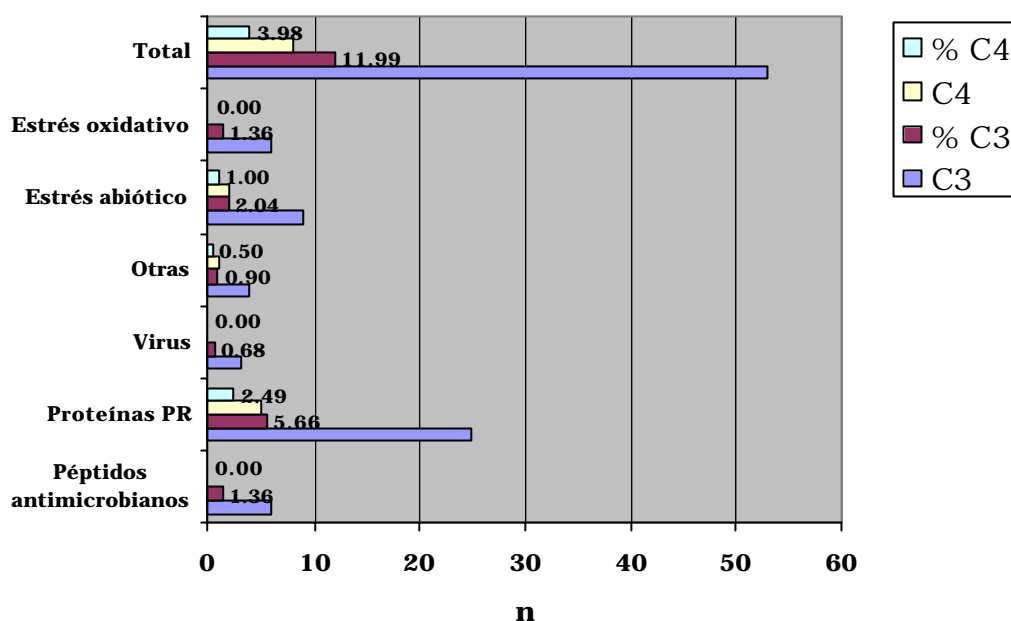


FIGURA 3.11.- Número de ESTs asignados a la categoría de defensa frente a patógenos y respuesta a estrés en las genotecas de C3 y C4. El porcentaje se expresa con respecto al total de clones secuenciados.

Defensa frente a patógenos

Entre los mecanismos de defensa de las plantas frente a patógenos, se encuentra la producción de proteínas relacionadas con la patogénesis. A este tipo pertenecen algunos péptidos antimicrobianos con los cuales se ha encontrado similitud entre los clones de la genoteca del estadio C3, como son las tioninas y snakinas.

Entre las secuencias que mostraron similitud con proteínas de defensa frente a patógenos en el cormo en estadio C3, aparecieron tres clones con similitud a gamma-tionina⁶¹. Las tioninas son pequeñas proteínas, tóxicas para bacterias, hongos, levaduras y células desnudas *in vitro* (Florack y Stiekema, 1994), que presentan 8 cisteínas en posiciones conservadas que dan lugar a cuatro puentes disulfuro (PROSITE, www.expasy.ch; Nitti y col., 1995), patrón que se encuentra en la secuencia obtenida en el cormo de azafrán (figura 3.12).

⁶¹ BM0056115



FIGURA 3.12.- A) Secuencia de aminoácidos del homólogo de tiónina en azafrán, mostrando en rojo las 8 posiciones con cisteína. B) Patrón de las cisteínas que intervienen en los cuatro puentes disulfuro de las tioninas (PROSITE).

Las tioninas participan en procesos de defensa frente a patógenos, inhibiendo el crecimiento de hongos mediante la inhibición de la síntesis proteica (Méndez y col., 1990) y mediante interacciones directas con proteínas de la membrana (Thevissen y col., 1996).

A este grupo de péptidos antimicrobianos también pertenecen las snakinas⁶², descritas en tubérculos de patata y activa contra patógenos bacterianos y fúngicos, las cuales se ha propuesto que pueden ser constituyentes de las barreras defensivas constitutivas, especialmente en órganos de reserva y reproductivos (Segura y col., 1999), presentando una regulación positiva en respuesta a heridas e infecciones fúngicas (Berrocal-Lobo y col., 2002).

Además de estos péptidos antimicrobianos, se han encontrado secuencias que mostraron similitud con otras proteínas implicadas en fenómenos de defensa frente a patógenos. Cabe destacar la aparición de similitudes con dos quitinasas diferentes. Una de ellas⁶³ (CsaC30015) apareció en 20 secuencias, únicamente en el estadio C3, mostrando similitud con quitinasas de muchas especies vegetales. Sin embargo, la secuencia obtenida a partir del cormo del azafrán, aunque agrupada junto con especies de monocotiledóneas, parece bastante alejada del resto (figura 3.13), presentando una delección de 29 aminoácidos unos 129 antes del final y otra de 14 unos 12 aminoácidos después. La otra

⁶² BM005619

⁶³ BM005616

similitud con quitinasas encontrada⁶⁴ (CsaC30451) apareció en una secuencia de C3 y 5 de C4 mostrando similitud con quitinasas presentes en especies de iridáceas (*Gladiolus*) y liliáceas (*Tulipa*).

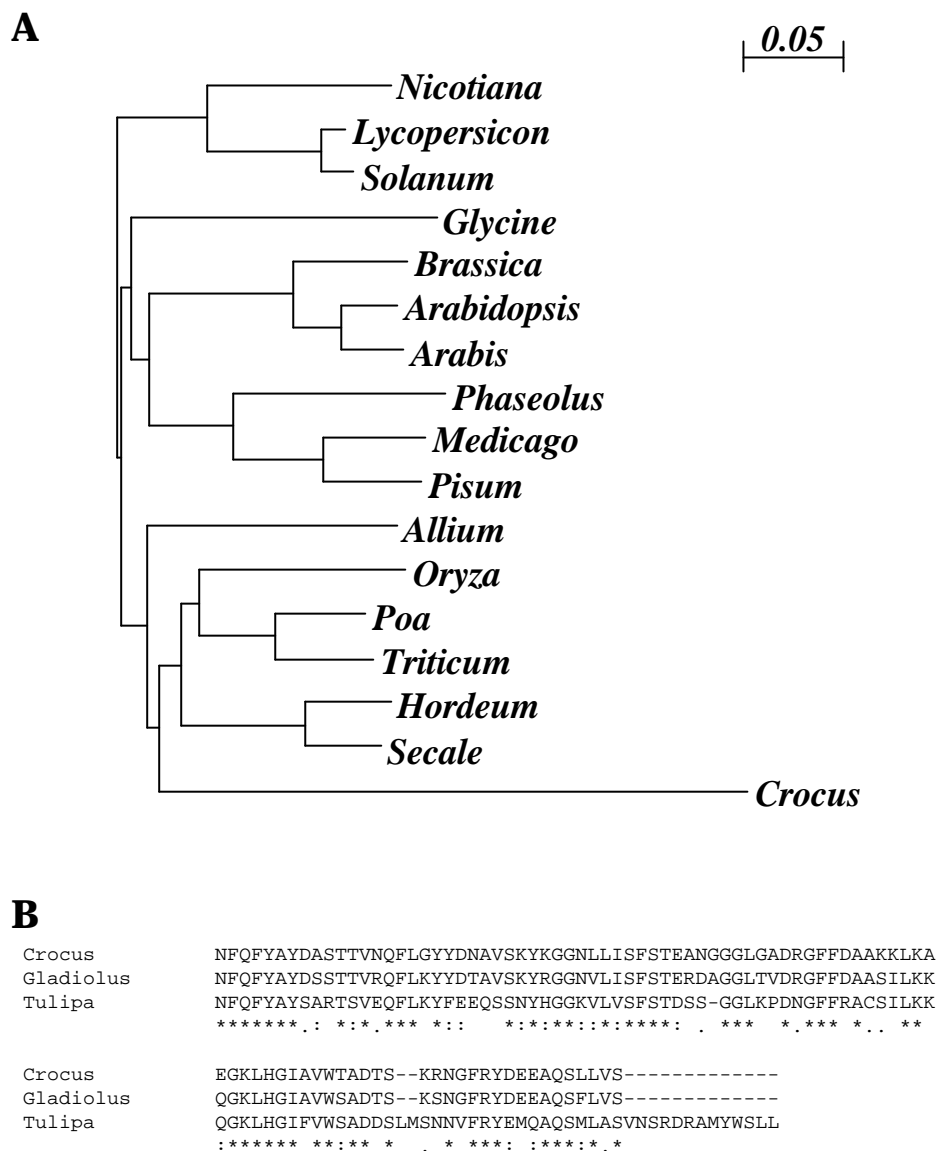


Figura 3.13.- A) Relaciones filogenéticas obtenidas de la comparación de las similitudes de CsaC30015. B) Alineamientos de las secuencias similares a CsaC30451.

Las quitinasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces β -1,4-N-acetilglucosamina presentes en la quitina. Como éste es el principal componente de las paredes vegetales de hongos y no se

⁶⁴ BM005637

encuentra en las plantas, las quitinasas juegan un importante papel en la defensa frente al ataque de patógenos, induciéndose su expresión como respuesta a la infección (Roby y col., 1990; Samac y Shah, 1991; Huynh y col., 1992; Gijzen y col., 2001). Además de esta importante función defensiva, se ha sugerido que ciertas proteínas similares a quitinasas pueden participar en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Zhong y col., 2002), o en la protección frente a heladas (Yeh y col., 2000; Ding y col., 2002). También se ha propuesto que ciertas quitinasas de clase III, muy abundantes en frutos en maduración, pueden actuar como proteínas de reserva que aporten aminoácidos para la formación de proteínas asociadas con la maduración (Peumans y col., 2002).

Entre las proteínas relacionadas con patogénesis, en el estadio C3 también se encontró una secuencia con similitud con taumatina⁶⁵, proteína implicada en defensa frente a patógenos fúngicos (Kuwabara y col., 2002; Wang y Ng, 2002; Zareie y col., 2002), y que además se ha encontrado asociada a procesos como la maduración o la acumulación de azúcares (Kim y col., 2002a).

Además, aparecieron 3 secuencias con similitud con inhibidores de poligalacturonasa⁶⁶, que también participan en la defensa frente a hongos (Yao y col., 1999; Powell y col., 2000; James y Dubery, 2001). Su acción retrasa la función de las poligalacturonasas secretadas por los hongos para degradar la pared celular vegetal, incrementando la concentración de poligalacturonanos que activan la expresión de otras proteínas defensivas como las quitinasas o las que intervienen en la síntesis de fitoalexinas (Hammond-Kosack y Jones, 2000).

Otro mecanismo de defensa frente a patógenos, concretamente frente a virus, es el silenciamiento post-transcripcional de genes (PTGS) inducido por la infección vírica (Hammond-Kosack y Jones, 2000; Mourrain y col., 2000). A este tipo pertenece el gen SGS3 de *Arabidopsis*, que debido a que no presenta similitud con ninguna

⁶⁵ BM005643

⁶⁶ BM005638, BM005626

proteína conocida, define un nuevo paso de PTGS en plantas, y del cual se ha encontrado una similitud entre los clones de la genoteca del estadio C3⁶⁷.

Entre los ESTs del estadio C3 asignados a esta categoría también se incluyeron una secuencia que mostró similitud con una proteína inducida por estrés de heridas de *Arabidopsis*⁶⁸ y otra que mostró similitud con una proteína de respuesta a elicitor⁶⁹ descrita en unas pocas especies vegetales.

En el estadio C4 aparecieron únicamente 5 clones con similitud con una quitinasa de *Gladiolus* que apareció también en C3 (CsaC30451) y una secuencia con similitud con una proteína de transferencia de lípidos⁷⁰ (LTP), que se ha sugerido que pueden participar en la señalización de la resistencia sistémica (Maldonado y col., 2002) y se han definido como alérgenos en otras especies vegetales (Díaz-Perales y col., 2002a,b).

Respuesta a estrés abiótico

En la genoteca de C3 se encontró una secuencia con similitud con proteínas abundantes en embriogénesis tardía⁷¹ (LEA). Estas proteínas fueron identificadas como genes inducidos en semillas durante la maduración y desecación (Ingram y Bartels, 1996). Se ha incluido en esta categoría porque en estudios posteriores se han encontrado asociadas a la tolerancia a distintos tipos de estrés: hídrico y salino (Riedl y Walker-Simmons, 1993; Xu y col., 1996; Oztur y col., 2002), o frío (NDong y col., 2002), resaltándose su elevado potencial como herramientas moleculares para la mejora genética de cultivos hacia la tolerancia al estrés (Xu y col., 1996).

Otro tipo de proteínas que intervienen en la repuesta frente a estrés abiótico son la metalotioneínas. Éstas son pequeñas proteínas ricas en cisteína ampliamente distribuidas entre los organismos eucariotas y

⁶⁷ BM005635

⁶⁸ BM005641

⁶⁹ BM005628

⁷⁰ BM956322

⁷¹ BM005596

procariotas y que constituyen uno de los sistemas que presentan las plantas para su protección en ambientes con concentraciones elevadas de metales pesados (Giritch y col., 1998; Suh y col., 1998; Cobbett y Goldsbrough, 2002; Liu y col., 2002). A pesar de que metales como el Cu o el Zn son esenciales para el normal crecimiento de las plantas, una concentración elevada puede ocasionar su inhibición y la aparición de síntomas de toxicidad (Hall, 2002). Se ha sugerido que las metalotioneínas también pueden jugar un papel como transportadores de iones metálicos hacia las regiones en crecimiento de la planta (García-Hernández y col., 1998). En el cormo en estadio C3 aparecieron tres clones que mostraron similitud con metalotioneínas⁷², mientras que en el C4 apareció uno de ellos⁷³.

Además, entre las proteínas de respuesta a estrés abiótico, en la genoteca del estadio C3 se encontró otra secuencia con similitud con una proteína de respuesta a bajas temperaturas,⁷⁴ mientras que entre las secuencias de la genoteca de C4 se encontró una con similitud con una proteína inducida por estrés de deshidratación⁷⁵. Estas reflejan las condiciones por las que atraviesa la planta. Mientras que en el estadio C3, en cormos recogidos durante el mes de febrero, hemos encontrado proteínas de respuesta a bajas temperaturas, en el estadio C4 la presencia de una proteína inducida por deshidratación nos indica las condiciones áridas por las que atraviesa el cormo durante el verano.

Defensa contra el estrés oxidativo

El estrés oxidativo se genera como resultado de la formación de especies activas de oxígeno que pueden dañar o matar las células. El estrés oxidativo puede originarse por causas medioambientales, como la polución, metales pesados, sequía, calor o frío, heridas, luz uv, o intensidades luminosas elevadas que estimulan la fotoinhibición (Bray y col., 2000). Entre las vías de defensa contra el estrés oxidativo se

⁷² BM005622, BM005631, BM005642

⁷³ CB250236

⁷⁴ BM005627

⁷⁵ BM956321

incluyen dos sistemas: antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. En la genoteca del estadio C3 se han encontrado similitudes con proteínas que participan en ambos sistemas. Concretamente, la catalasa⁷⁶ es un antioxidante enzimático, que consume el peróxido de hidrógeno mediante su conversión en agua y oxígeno. Su actividad va también ligada a la respuesta frente al ataque de patógenos, pues éstos causan un incremento en intermedios reactivos de oxígeno, lo cual, en plantas con una capacidad reducida de detoxificación mediante la supresión de la actividad de enzimas como la catalasa, puede llevar a la muerte celular programada (Mittler y col., 1999).

El sistema de antioxidantes no enzimáticos está compuesto por moléculas que presentan capacidad antioxidante, como el ascorbato, el glutatión reducido, el α -tocoferol o los carotenoides. En el cormo en estadio C3 se ha encontrado una secuencia con similitud con la dehidroascorbato reductasa⁷⁷, que participa en la principal vía antioxidante de los plástidos: el ciclo ascorbato-glutatión.

Detoxificación

En el estadio C3 se ha encontrado otra secuencia con similitud con la formaldehído deshidrogenasa⁷⁸, o alcohol deshidrogenasa de clase III, enzima implicada en procesos de detoxificación del formaldehído (Giese y col., 1994), y cuyo grado de conservación estructural entre microorganismos, plantas y animales indica su importancia universal (Shafqat y col., 1996; Fliegmann y Sandermann Jr., 1997).

En el estadio C4 se han encontrado dos clones con similitud con alcohol deshidrogenasa⁷⁹.

En el cormo en estadio C3 se ha encontrado un porcentaje importante de secuencias con similitudes con proteínas implicadas en muchos mecanismos de defensa frente a patógenos y de respuesta a estrés abiótico (tabla 3.10). Entre ellos, hay proteínas relacionadas con

⁷⁶ BM005632

⁷⁷ BM005629

⁷⁸ BM005655

⁷⁹ BM956331, BM956332

patogénesis como las quitinasas o inhibidores de la poligalacturonasa, proteínas de defensa frente a virus que participan en el silenciamiento postranscripcional de genes, varias proteínas de respuesta a diversos tipos de estrés ambiental: salino, bajas temperaturas, etc., o proteínas implicadas en procesos de defensa frente al estrés oxidativo como la catalasa. Todo ello sugiere que el cormo está sometido a una presión ambiental elevada, tanto por parte de infección de patógenos como por estrés abiótico. Además, se podrían añadir otras secuencias con similitud con proteínas que se expresan en respuesta a estrés, como pueden ser las chaperoninas o los retrotransposones. Los procesos defensivos y de respuesta a estrés presentan una gran importancia en el cormo en estadio C3, durante su máximo engorde, equiparable a otros procesos fundamentales para el desarrollo celular como los metabólicos o la síntesis proteica. Sin embargo, durante el estadio C4, la expresión de proteínas relacionadas con defensa y respuesta a estrés es mucho menor, al igual que ocurre con el resto de categorías establecidas excepto la relativa al transporte.

TABLA 3.10.- Resumen del número de ESTs asignados a la categoría de defensa frente a patógenos y respuesta a estrés encontrados en el estadio C3.

Proceso	nº de clones
Defensa frente a patógenos	
Péptidos antimicrobianos	
• Tioninas	3
• Snakinas	3
Proteínas relacionadas con patogénesis (PR)	
• Quitinasas	21
• Inhibidor de poligalacturonasa	3
• Taumatina	1
Protección frente a virus	3
Otras	4
Respuesta a estrés abiótico	
LEA	1
Metalotioneínas	3
Otras	5
Estrés oxidativo	
Catalasa	4
Dehidroascorbato reductasa	2
TOTAL	53

3.2.9.- Metabolismo

Metabolismo de carbohidratos

Uno de los componentes mayoritarios del cormo son los carbohidratos, que se encuentran en cantidades del 22,55 % de la materia fresca, siendo el principal compuesto el almidón (Farooq y col., 1985). El metabolismo de carbohidratos debe ser un proceso fundamental en el desarrollo del cormo.

En el estadio C3 aparecieron secuencias que mostraron similitud con proteínas implicadas en el metabolismo de carbohidratos. Una secuencia mostró similitud con una fosfoglucomutasa⁸⁰, enzima que participa en el mantenimiento del equilibrio del *pool* de hexosas fosfato, cuyo principal destino es la vía glicolítica. Además, aparecieron dos secuencias incluidas en vías catabólicas de generación de hexosas fosfato (Dennis y Blakeley, 2000): la sacarosa sintasa⁸¹ que cataliza la degradación de sacarosa para formar UDP-glucosa y fructosa, y una fosforilasa de almidón⁸² implicada en la degradación del almidón, dando como resultado glucosa-1-fosfato. Además, apareció otra secuencia con similitud con la UDP-glucosa pirofosforilasa⁸³, que cataliza la transformación de glucosa-1-fosfato en UDP-glucosa, en una reacción fácilmente reversible. Todas estas enzimas parecen dirigidas hacia la síntesis de UDP-glucosa, que puede ser empleada como sustrato en la formación de los polisacáridos de la pared celular (figura 3.14). Como se ha visto en el apartado anterior de organización celular, en este estadio hay una elevada actividad de cambios en la pared celular, necesario para el crecimiento celular.

⁸⁰ BM005673

⁸¹ BM005654

⁸² BM005653

⁸³ BM005650

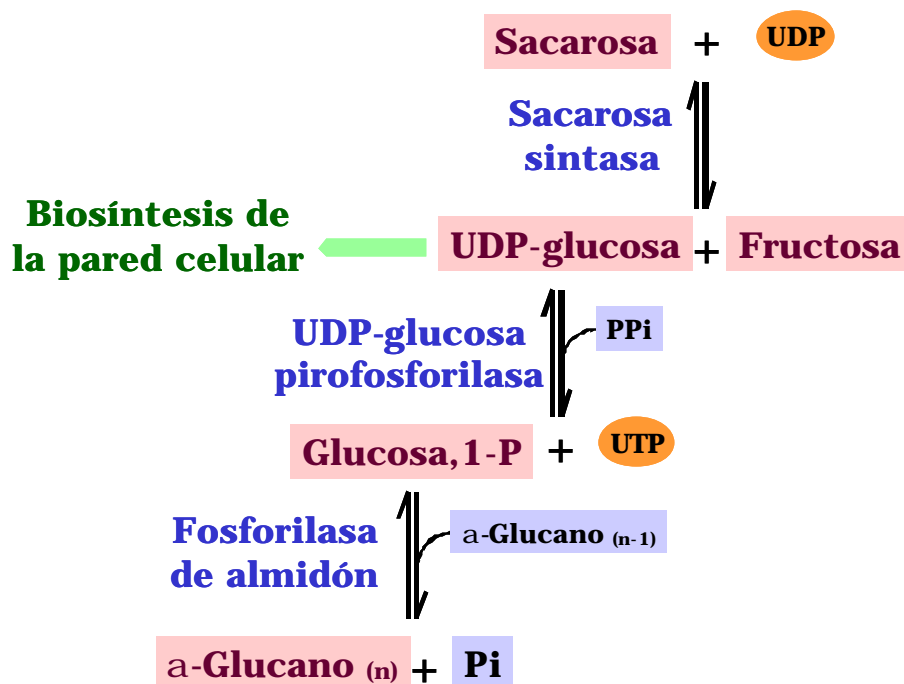


FIGURA 3.14.- Enzimas encontradas en la genoteca de C3 que intervienen en el metabolismo de carbohidratos.

La importancia de la sacarosa sintasa radica en la movilización de la sacarosa hacia diversas vías, que son importantes en funciones estructurales, de reserva y metabólicas en las células vegetales (Ruan y col., 1997). Se ha visto que juega un papel importante en la formación de almidón en tubérculos de patata (Zrenner y col., 1995), en maíz (Shannon y col., 1996) o en tomate (Wang y col., 1997), siendo la principal enzima responsable de la degradación de la sacarosa que llega desde los órganos fotosintéticos. En este periodo, la planta de azafrán presenta hojas verdes, por lo que está realizando la fotosíntesis, cuyo principal resultado es la formación de sacarosa que se distribuye por toda la planta. Por lo tanto, es coherente la presencia de la sacarosa sintasa en el cormo donde dirige a la sacarosa hacia la formación de hexosas fosfato para que sean utilizadas en diversas vías metabólicas, una de las cuales puede ser la formación de almidón como reserva.

Sin embargo, entre las secuencias del estadio C3 no se han encontrado similitudes con enzimas implicadas en el proceso de la síntesis de almidón. Sí se ha encontrado una secuencia con similitud con la trehalosa-6-fosfato sintasa⁸⁴. Esta enzima participa en la formación de trehalosa, que induce la expresión de ADP-Glucosa pirofosforilasa y la síntesis de almidón (Wingler y col., 2000). Además, la trehalosa se ha visto que está implicada en otra serie de procesos de tolerancia frente a diversos tipos de estrés abiótico (Garg y col., 2002; Jang y col., 2003). Concretamente, se ha visto un incremento en los niveles de trehalosa durante la fase de dormancia que superan las conocidas como plantas de la resurrección, que habitan en zonas desérticas, protegiéndolas frente al estrés hídrico y permitiendo su vuelta a la actividad cuando el agua está disponible (Goddijn y Smeekens, 1998). La presencia de trehalosa podría ser un metabolito importante en el cormo de azafrán a la hora de superar las sequías estivales. Sin embargo, también se ha sugerido que en plantas superiores su función no es importante en la protección frente al estrés, sino que puede estar participando de otras múltiples formas en la regulación del metabolismo de carbohidratos (Goddijn y Smeekens, 1998; Goddijn y van Dun, 1999; Rolland y col., 2002). Hasta la fecha, no se ha descrito la presencia de trehalosa en los cormos de azafrán, aunque se conoce que el porcentaje de azúcares no reductores en el cormo es de 0,84 % de la materia fresca (Farooq y col., 1985).

Nuestros datos sugieren que, aunque en el momento de la recogida de los cormos para el análisis, durante el mes de febrero, la síntesis de polisacáridos de reserva puede estar llevándose a cabo, no será hasta un estado más avanzado del estadio C3 cuando ésta alcanzará sus valores máximos. Probablemente durante el mes de marzo, cuando la duración del día es mayor, y por lo tanto se incremente la actividad fotosintética, se produzca un mayor aporte de sacarosa al cormo y una mayor derivación hacia la formación de almidón.

⁸⁴ BM005686

En el estadio C4 no han aparecido secuencias que mostraran similitud con proteínas implicadas en el metabolismo de carbohidratos. En este estadio, la planta únicamente se compone del cormo, por lo que no se están sintetizando nuevos carbohidratos al no realizar la fotosíntesis. Sin embargo, en C4 se encontró la secuencia de la proteína de reserva mayoritaria del cormo, una lectina de unión a mananos⁸⁵ (Escribano y col., 2000). Esto concuerda con los resultados obtenidos en el análisis de expresión de esta proteína, en el que se ha visto que alcanza su máximo durante los meses estivales (figura 3.26).

Por lo tanto, la acumulación de reservas en el cormo sucede en dos etapas: durante los meses de febrero y marzo, en los que el cormo hijo presenta su máximo crecimiento, se produce la acumulación de carbohidratos. Durante este periodo la planta presenta hojas verdes, por lo que realiza la fotosíntesis y la fijación de carbono en forma de azúcares. En la segunda etapa, durante los meses estivales, cuando las hojas se han secado y el cormo ha adquirido su tamaño definitivo, se produce la acumulación de proteínas de reserva que servirán para aportar aminoácidos en el momento de la brotación y la floración.

Metabolismo energético

Tanto en la genoteca del estadio C3 como en la del estadio C4 aparecieron secuencias que mostraron similitud con enzimas que catalizan reacciones de la glicolisis. Concretamente, en el estadio C3 se encontraron clones con similitud con la fosfofructoquinasa⁸⁶ y con la enolasa⁸⁷, mientras que en C4 aparecieron secuencias con similitud con la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa⁸⁸ y con la piruvato quinasa⁸⁹. Asimismo, aparecieron enzimas de otras vías del metabolismo energético, principalmente en el estadio C3, donde se encontraron secuencias con similitud con la succinato deshidrogenasa⁹⁰ o la malato

⁸⁵ BM956327

⁸⁶ BM005670

⁸⁷ BM005675

⁸⁸ BM956338

⁸⁹ BM956340

⁹⁰ BM005678

deshidrogenasa⁹¹ del ciclo de Krebs, y con la NADH ubiquinona oxidoreductasa⁹², la citocromo c oxidasa⁹³ o la ATPasa mitocondrial⁹⁴ que catalizan reacciones de la fosforilación oxidativa. En el estadio C4 también aparecieron dos secuencias con similitud con la citocromo c oxidasa⁹⁵. Estos datos sugieren que la producción de energía se está realizando en los dos estadios, si bien, el mayor número de secuencias con similitud con estas enzimas en C3 indican que éste es un estadio más activo.

3.2.10.- Función desconocida

Tanto en el estadio C3 como en C4 ha aparecido un porcentaje muy elevado de secuencias que no mostraron similitud significativa o cuya similitud fue con proteínas de función desconocida o hipotéticas (tabla 3.11, figura 3.15).

TABLA 3.11.- Número de ESTs incluidos en la categoría de función desconocida y porcentaje respecto al total.

	C3		C4	
	n	%	n	%
Similitud con proteínas de función desconocida	22	4,90	20	9,95
Sin similitud significativa	160	35,63	101	50,25
Total	182	40,53	121	60,20

Un 36 % de las secuencias totales de C3 y un 52 % de las secuencias obtenidas en C4 no mostró similitud significativa cuando se comparó con las bases de datos de GenBank, en las que actualmente se incluyen más de 18 millones de secuencias (www.ncbi.nlm.nih.gov) de más de 105.000 organismos (Benson y col., 2002). Este alto porcentaje indica la carencia de estudios de genómica sobre especies similares al azafrán, o sobre especies que presenten cormos en general.

⁹¹ BM005676, BM005651

⁹² BM005647, BM005683

⁹³ BM005684, BM005671

⁹⁴ BM005689

⁹⁵ BM956336, BM956337

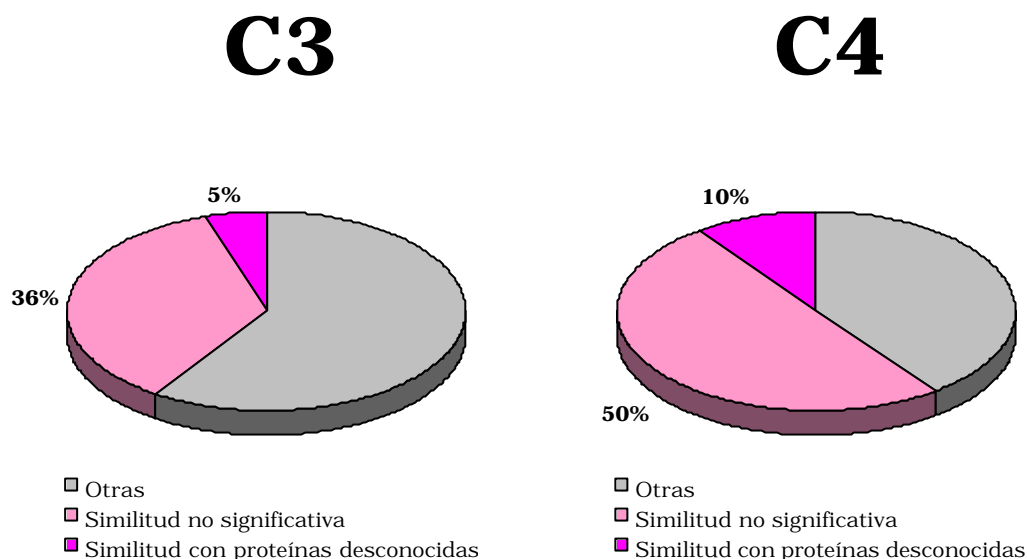


FIGURA 3.15.- Porcentaje de secuencias que no mostraron similitud significativa y que mostraron similitud con proteínas de función desconocida o hipotéticas.

Sin embargo, a pesar de que estas cifras pueden parecer muy elevadas, todavía hay mucha información acerca de la función de proteínas que falta en las bases de datos. Alrededor de un 30 % de las proteínas secuenciadas en el genoma de *Arabidopsis* no han podido ser asignadas a ninguna clase funcional mediante comparación con proteínas de función conocida presentes en éstas (*The Arabidopsis Genome Initiative*, 2000) y se estima que únicamente un 50 % de las búsquedas son positivas (Somerville y Somerville, 1999).

Muchas de estas secuencias pueden corresponder a genes específicos del cormo que participen en su desarrollo y serán secuencias interesantes para usar como dianas en su caracterización.

3.2.11.- Resumen

Se aprecian diferencias claras en las similitudes obtenidas para las secuencias de los estadios C3, caracterizado por la acumulación de reservas y C4, en estado de dormancia.

El porcentaje de secuencias con similitud con proteínas implicadas en la síntesis proteica, su plegado, direccionamiento y degradación es mayor en el estadio C3. Este resultado es esperable, e indica la mayor actividad que se realiza en el cormo durante su engorde y acumulación de sustancias de reserva. Por el contrario, la escasa actividad del cormo en estadio C4 concuerda con el periodo de dormancia de los meses de verano. Este hecho se ve apoyado por los resultados obtenidos en otras categorías, en las que se han encontrado secuencias con similitud con proteínas modificadoras y de relajación de la pared celular, además de un número mayor de secuencias con similitud con proteínas implicadas en los procesos de percepción y transducción de señales o con factores de transcripción relacionados con el crecimiento y la división celular en el estadio C3.

Han aparecido diferencias destacables en la categoría de respuesta a patógenos y estrés, de las que se ha encontrado un porcentaje mucho mayor de secuencias en el estadio C3. El cormo es un órgano subterráneo que está expuesto al ataque de patógenos principalmente fúngicos, así como a condiciones ambientales desfavorables, a lo que responde con la expresión de genes que codifican para proteínas implicadas en procesos de defensa frente a éstos. El porcentaje de estas secuencias menor en C4 puede ser debido a que las altas temperaturas y sequía estivales disminuyan la proliferación de patógenos y no se expresen los genes inducidos por su ataque.

En la categoría de transporte se ha encontrado que la tendencia es inversa, es decir, el porcentaje de secuencias con similitud con proteínas de esta categoría es mayor en el estadio C4, posiblemente debido a la distribución de los compuestos celulares hacia sus compartimentos para superar la dormancia.

En cuanto al metabolismo de carbohidratos, únicamente se encontraron secuencias con similitud con enzimas de esta categoría en el estadio C3. Ello es debido a que este es el estadio en el que se produce el engorde del cormo, y cuando la planta presenta hojas verdes y actividad fotosintética, por lo que los azúcares deben estar siendo

transportados hacia el cormo en forma de sacarosa, y allí transformados para su almacenamiento.

Por último, en el apartado de función desconocida han aparecido un número elevado de secuencias en ambos estadios, que pueden ser el resultado de genes específicos de cormo o genes que se expresen como respuesta a estados fisiológicos como la dormancia.

3.2.12.- Patrón de expresión

Para estudiar la expresión de los genes secuenciados, se seleccionaron 96 de las secuencias obtenidas del estadio C3, en las cuales se obtuvo similitud significativa con proteínas conocidas y se inmovilizaron en membranas de nitrocelulosa para su hibridación con ARN total de los estadios C1-C2, C4 y C6. Los clones seleccionados se reflejan en la figura 3.16.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CsaC3 0287	CsaC3 0062	CsaC3 0066	CsaC3 0098	CsaC3 0122	CsaC3 0173	CsaC3 0187	CsaC3 0270	CsaC3 0277	CsaC3 0297	CsaC3 0360	CsaC3 0409
B	CsaC3 0010	CsaC3 0126	CsaC3 0141	CsaC3 0146	CsaC3 0163	CsaC3 0189	CsaC3 0194	CsaC3 0215	CsaC3 0218	CsaC3 0290	CsaC3 0294	CsaC3 0299
C	CsaC3 0356	CsaC3 0393	CsaC3 0041	CsaC3 0222	CsaC3 0382	CsaC3 0009	CsaC3 0067	CsaC3 0197	CsaC3 0237	CsaC3 0383	CsaC3 0507	CsaC3 0512
D	CsaC3 0014	CsaC3 0055	CsaC3 0095	CsaC3 0230	CsaC3 0231	CsaC3 0279	CsaC3 0018	CsaC3 0022	CsaC3 0080	CsaC3 0128	CsaC3 0129	CsaC3 0322
E	CsaC3 0362	CsaC3 0384	CsaC3 0500	CsaC3 0546	CsaC3 0044	CsaC3 0123	CsaC3 0170	CsaC3 0227	CsaC3 0243	CsaC3 0351	CsaC3 0378	CsaC3 0003
F	CsaC3 0004	CsaC3 0021	CsaC3 0027	CsaC3 0040	CsaC3 0046	CsaC3 0118	CsaC3 0192	CsaC3 0205	CsaC3 0213	CsaC3 0266	CsaC3 0368	CsaC3 0387
G	CsaC3 0485	CsaC3 0575	CsaC3 0377	CsaC3 0016	CsaC3 0020	CsaC3 0023	CsaC3 0038	CsaC3 0047	CsaC3 0053	CsaC3 0065	CsaC3 0086	CsaC3 0097
H	CsaC3 0135	CsaC3 0145	CsaC3 0184	CsaC3 0232	CsaC3 0239	CsaC3 0293	CsaC3 0499	CsaC3 0310	CsaC3 0359	CsaC3 0364	CsaC3 0420	CsaC3 0432

Figura 3.16.- ESTs seleccionados para el estudio del patrón de expresión en distintos estadios del cormo de azafrán.

La señal obtenida de la hibridación con ARN proveniente del estadio C6 fue muy baja en general con todos los clones, por lo que este estadio se excluyó del análisis. Entre los otros dos estadios, la expresión en general fue mayor en C4 que en C1-C2 (figura 3.17), aunque ciertas proteínas mostraron diferencias muy pequeñas o incluso mostraron la tendencia contraria.

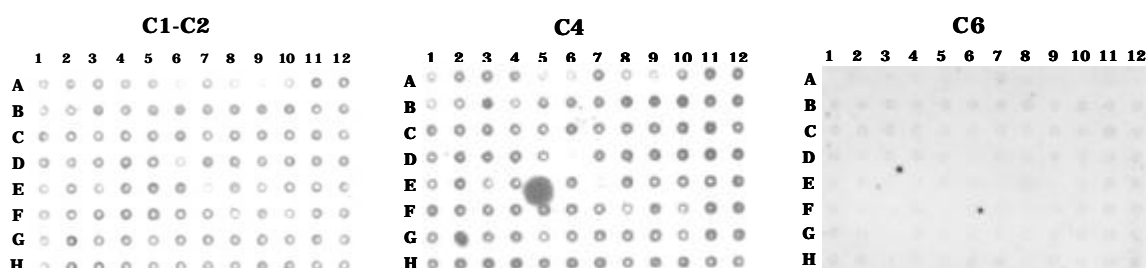


Figura 3.17.- Resultado de la hibridación de las membranas con ARN total de los estadios C1-C2, C4 y C6.

En este estudio de hibridación, se han observado diferencias en cuanto a la intensidad de la señal obtenida. En el estadio C6, con el corno en estado senescente, la expresión fue muy baja para todos los clones incluidos en el estudio, lo cual remarca este estado senescente, en el que la actividad del corno se mantiene a niveles muy reducidos.

Entre los otros dos estadios, la señal fue en general mayor para el C4 que para el C1-C2, como se puede apreciar en las proteínas ribosómicas incluidas en este estudio (figura 3.18). Esto puede ser debido al mayor parecido entre los estadios C3 y C4, en el que el corno se encuentra ya formado y se produce únicamente su engorde, que entre C3 y C1-C2. Las diferencias en la señal de hibridación fueron muy grandes entre las proteínas incluidas en la categoría de defensa frente a patógenos y respuesta a estrés. Esto puede ser debido a que el corno en estadio C1-C2 todavía depende en gran medida del corno materno, por lo que la defensa debe ser llevada a cabo por éste. Sin embargo, en C4 el corno se ha independizado, por lo que es él mismo el que debe responder a las agresiones externas.

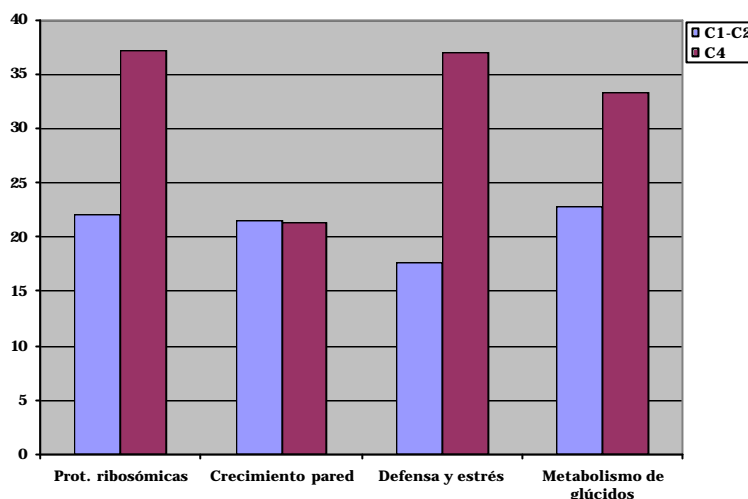


FIGURA 3.18.- Comparación de los niveles de intensidad de señal entre los estadios C1-C2 y C4. Se muestran las categorías de proteínas ribosómicas, crecimiento de la pared, defensa frente a patógenos y estrés y metabolismo de glúcidos como media de los clones incluidos en éstas y medidos en unidades arbitrarias de intensidad de señal.

En la categoría de metabolismo de glúcidos, también se aprecia una mayor señal en el estadio C4. Las proteínas incluidas en esta categoría están envueltas en procesos de acumulación de reservas, por lo que también es lógico un mayor nivel de expresión al final del desarrollo que en sus fases tempranas. Ya se ha comentado que durante el estadio C4 se produce principalmente la acumulación de proteínas de reserva en detrimento de los carbohidratos. Sin embargo, el proceso de acumulación de carbohidratos de reserva parece continuar hasta el comienzo de la brotación, aunque este se produzca a menor nivel.

Se observa una tendencia contraria en las proteínas de crecimiento de la pared celular, entre las que se incluyeron los clones que mostraron similitud con expansina, xiloglucano transglicosilasa y pectinesterasa. En conjunto, la señal fue muy ligeramente superior en el estadio C1-C2, aunque ha sido entre estas proteínas donde se han encontrado clones que mostraron una mayor intensidad de señal en el estadio C1-C2, concretamente de los clones que mostraron similitud con xiloglucano transglicosilasa y pectinesterasa. Este hecho indica el estado de crecimiento de este estadio, en el que se produce la brotación y la consiguiente multiplicación celular y crecimiento de la pared.

3.3.- CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA MAYORITARIA DE RESERVA

3.3.1.- Análisis de la secuencia

En estudios anteriores de nuestro grupo, se vió que la proteína mayoritaria del cormo de azafrán pertenecía a la familia de las lectinas de unión a manano de las monocotiledóneas (Escribano y col., 2000). Esta proteína se sintetiza como un polipéptido precursor de alrededor de 28 kDa, que sufre un procesamiento postraduccionnal para dar lugar a dos subunidades maduras de 12 y 12,6 kDa (figura 3.19), que se agrupan en tetrámeros (Escribano y col., 2000).

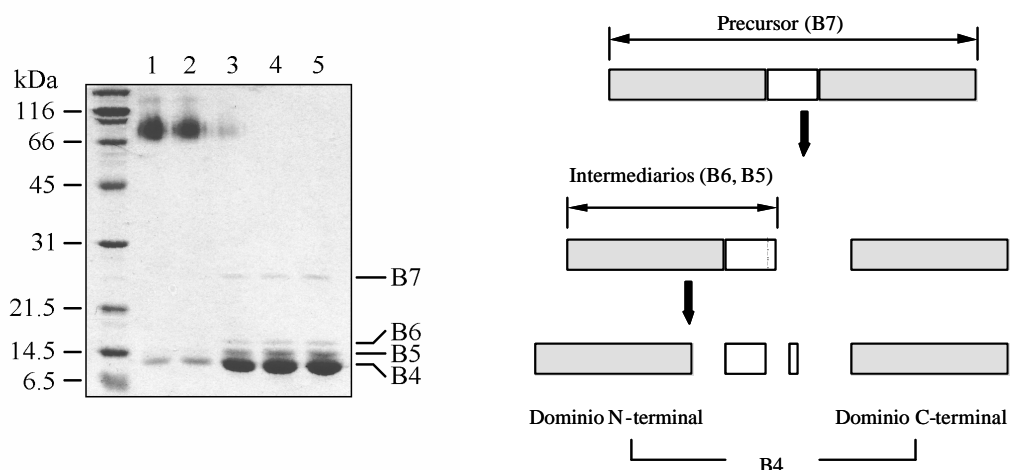


Figura 3.19.- A) Análisis mediante SDS-PAGE de la lectina de cormo de *C. sativus*. Alícuotas de 10 mg de lectina purificada mediante HPLC incubadas en ausencia de agentes reductores a temperatura ambiente (pocillo 1), 40 °C (pocillo 2), 60 °C (pocillo 3), 80 °C (pocillo 4), o 100 °C (pocillo 5) se analizaron mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12,5 % con SDS. Las proteínas se tiñeron con azul de Coomassie. En la izquierda se muestran los marcadores de peso molecular. B) Modelo del proceso de maduración de la lectina de *C. sativus*. Un precursor de 28 kDa constituido por dos dominios da lugar a los polipéptidos de 12,6 y 11,9 kDa, que corresponden a los dominios N- y C-terminal respectivamente. El polipéptido B6 (banda B6 de A) podría corresponder a un intermediario que, después de la rotura del péptido C-terminal putativo, da lugar a la subunidad madura correspondiente al dominio N-terminal del precursor. (Escribano y col., 2000)

Este tipo de procesamiento es muy común en lectinas similares (Wilkins y Raikhel, 1989; Chrispeels y Raikhel, 1991; Hirai y col., 1993; Yang y Czaplá, 1993; Smeets y col., 1994; Bezerra y col., 1995; Koike y col., 1995; Van Damme y col., 2000). La secuencia de aminoácidos del extremo N-terminal de ambas subunidades ya ha sido descrita (Escribano y col., 2000).

A continuación se secuenció la parte codificante del gen mediante amplificación directa por PCR sobre el ADN genómico y posterior secuenciación del fragmento resultante (GenBank AF347116). En la secuencia de nucleótidos obtenida se encontraron varias indeterminaciones, ocasionadas por la posible presencia de dos nucleótidos distintos, que pueden dar lugar a diferentes isoformas. Ya se ha definido que esta proteína puede tener un alto número de isoformas mediante análisis de electroforesis bidimensional (Escribano y col., 2000) o mediante secuenciación de aminoácidos (Oda y Tatsumi, 1993). Por otra parte, la secuenciación de la parte codificante del gen de la lectina a partir del producto de PCR obtenido usando ADN genómico como molde, únicamente nos indica la existencia de isoformas, si bien, no podemos establecer la secuencia concreta de éstas. Para ello será necesario recurrir al clonaje de la lectina y la secuenciación de un elevado número de clones, cada uno de los cuales corresponderá a una isoforma.

La secuencia del extremo 3' no resultó clara, por lo que se secuenciaron diversos clones procedentes de una librería de ADNc de cormo de azafrán que mostraron similitud con lectinas de unión a mananos. Se observó la presencia de dos mensajeros, que únicamente diferían en una inserción de 16 nucleótidos cerca del codon de parada en uno de ellos (figura 3.20). El extremo no codificante de ambos mensajeros es idéntico, con una señal de poliadenilación putativa (AATAAA) 33 nucleótidos aguas abajo del codon de parada.

```
ADNc 1:      109 CGCCGTCTGGTCCACTGCTTCACCTGCTAGGGGTGGTGCTTCGGCTGCCCTTTAA 55
ADNc 2:       93 TGCCGTCTGGTCCACCGCTTC-----GCTTCGGCTGCCCTTTAA 55

ADNc 1:       56 TGTATGCAGTCTACCCTGGCTTGTAGTCTTAATAAATAAACGGAGCTAATCACTA 1
ADNc 2:       56 TGTATGCAGTCTACCCTGGCTTGTAGTCTTAATAAATAAACGGAGCTAATCACTA 1
```

FIGURA 3.20.- Comparación de las dos secuencias encontradas a partir de la secuenciación de clones procedentes de una librería de ADNc de cormo de azafrán. Se muestra la diferencia del extremo 3', con la inserción de 16 nucleótidos en el primero. En negrita se muestra el codón de parada. La secuencia subrayada muestra una señal de poliadenilación putativa.

La comparación de las secuencias obtenidas a partir de ADN genómico y de los mensajeros encontrados, reveló la inexistencia de intrones, lo que ha sido observado en este tipo de proteínas (Harada y col., 1990). Además, la presencia de dos mensajeros indica que el gen que codifica para esta lectina está presente en al menos dos copias, uno con una región codificante de 792 pb y el otro con 818 pb, ambos carentes de intrones.

En otras especies, se han encontrado dos lectinas muy similares (Van Damme y col., 2000), lo que concuerda con la aparición de dos mensajeros diferentes en el cormo de azafrán. En embriones de arroz se ha encontrado también esta diversidad de mensajeros que codifican la misma lectina (Wilkins y Raikhel, 1989). Sin embargo la diferencia en éstos se ha encontrado en el extremo 3' no traducido, mientras que las diferencias en la lectina de azafrán se incluyen en la secuencia codificante, antes del codón de parada, dando lugar a dos proteínas, siendo una de ellas ligeramente de mayor tamaño. La aparición de dos mensajeros diferentes puede estar indicando que la lectina está codificada por una familia génica. Este hecho ya ha sido descrito para otras lectinas (Van Damme y col., 1993; Jordan y Goldstein, 1994),

estando los genes que las codifican en tándem, en el mismo grupo de ligamiento (Lu y col., 1994).

En la secuencia traducida de aminoácidos se determinó la presencia de un péptido señal correspondiente a los primeros 24 aminoácidos (Nielsen y col., 1997) y la secuencia de las dos subunidades de que consta se dedujo a partir de las secuencias parciales de aminoácidos del extremo amino terminal de ambas (Oda y Tatsumi, 1993; Escribano y col., 2000), pues no se encontró ninguna secuencia consenso para proteasas (Figura 3.21).

```
ATGGCAAAGTCCCTAGTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCGCCCTCCTCCTGGCCGCTCCGCTCGCCTCCCTAGCCGACAACAACGTCCTCC
M A K S L V L S S L L L A L L L A A P L A S L A D N N V L
TGACCGGCGACGTCCTCCACACCGACAACAGCTCTCTTCGAATCGGCCGCTTCGTGATGCAAGGCGACTGCAACTTGGTTCTGTA
L T G D V L H T D N Q L S F E S A A F V M Q G D C N L V L Y
CAACGAGGCGCGGCGCTTCCAATCCAACACCCACGGGCGAGGAGTCGGCTGCACCCCTCACGCTCAACAACCTCGGCCAGCTCGAAATC
N E A G G F Q S N T H G R G V G C T L T L N N L G Q L E I
CACAGCGCCAACCTCAACACCCCCGCTCTGGGTCTCCCCCGCAACATCAACACCGTCCAGGGCAACTACGCCGCGCTCCTCGGTCCCG
H S A N S N T P V W V S P R N I N T V Q G N Y A A V L G P
ACCAGCACGTCAACATCTACGGGCCCGCCATCTGGTCCACACCCGCCCCCAACCGTCACGAACCGCGGCGCTACCGTGTCAATATCCC
D Q H V T I Y G P A I W S T P A P N R H E R G A T V S N I P
CCGGGTGCGGAACGTGCTCTTCTCGTCGCGAGGTGATGTCCGACAACGCGCAGCTGGCGACGAGAGACTACAGCCTGGTCATGAGGGAC
R V R N V L F S S Q V M S D N A Q L A T R D Y S L V M R D
GACTGCAACCTGGCTCTCACCAAAGGGAGCNAAACCAACATCGTGTGGGAGTCGGGGACTTCGGGCAGGGGGCAGCACTGCTTCATGA
D C N L A L T K G S K T N I V W E S G T S G R G Q H C F M
GGCTCGGGCACACCGGGCTGATCGAGATCAGCGACGACCGCTCAACACCGTGTGGCGCAGCAACACCGTCGGGCAGGAAGGGGACTA
R L G H T G L I E I S D D R L N T V W R S N T V G Q E G D Y
CGTTCTCATCTCCAGATCAACGGGCAGGCGGTCTCTACGGACCCGCGCTCTGGTCCACCGCTTCTTCGGCTTCGGGTGCCCTTTAA
V L I L Q I N G Q A V V Y G P A V W S T A S S A S G A L *
```

←PARG→

FIGURA 3.21.- Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de la parte codificante del gen de la proteína mayoritaria de reserva del cormo de azafrán. En rojo se muestra la secuencia de un péptido señal. En azul se muestra la secuencia del dominio amino-terminal. En verde se muestra la secuencia del dominio carboxilo-terminal.

Se ha descrito que la presencia de un propéptido glicosilado en el extremo carboxilo terminal puede ser necesaria para la correcta ubicación de algunas lectinas en vacuolas (Bednarek y col., 1991; Wilkins y col., 1991). Sin embargo, el análisis de la secuencia en las bases de datos no ha revelado este tipo de péptido en la secuencia de la lectina. Si se ha observado la presencia de una secuencia relacionada

con un péptido señal en el extremo amino-terminal, que no forma parte de la lectina madura, y cuyo sitio de corte concuerda con el comienzo de la secuencia N-terminal de la lectina obtenida mediante secuenciación de la lectina purificada (Escribano y col., 2000). Este hecho concuerda con los estudios en los que se ha visto que las lectinas suelen tener un péptido señal de entre 20 y 30 aminoácidos y muy hidrofóbico (Yamamoto y col., 1994). Se ha descrito que la presencia de este péptido señal en el extremo N-terminal es fundamental para la traslocación de la proteína a través de la membrana del RE, y es eliminado cuando la proteína emerge en el lumen, ya que su incorrecta eliminación puede causar graves efectos detrimentales al quedar la proteína anclada a la pared del RE (Vitale y Denecke, 1999). Este hecho nos lleva a considerar que las lectinas se incorporan a la ruta de secreción, si bien la localización celular de esta proteína no queda esclarecida. Posiblemente se encuentre almacenada en vacuolas de reserva.

La secuencia de la subunidad carboxilo coincide con la hallada por Oda y Tatsumi (1993) para los 20 primeros aminoácidos. Sin embargo, a pesar de encontrar variaciones en la secuencia del gen que dan lugar a variaciones en la cadena de aminoácidos, en nuestro caso no hemos visto la variación que definen en la posición número 16, que da lugar a tres isoformas (Ser, Trp ó Arg), pues solo hemos encontrado una Ser. Esta diferencia puede ser debida a los distintos orígenes de las muestras analizadas.

Se determinó el peso molecular teórico de ambas subunidades a partir de la secuencia de aminoácidos (tabla 3.12). El peso molecular de la subunidad amino, se calculó entre el primer aminoácido de la subunidad (D25) y una arginina en la posición 136 (R136). El de la subunidad carboxilo, se calculó entre los aminoácidos N145 y A259. Los resultados coinciden con los obtenidos por Escribano y col. (2000) realizados mediante análisis con MALDI-MS.

TABLA 3.12.- Peso molecular teórico de la proteína completa y de las dos subunidades de las que se compone.

	Peso molecular (Da)
Lectina	28.134,67
Subunidad amino	11.992,24
Subunidad carboxilo	12.632,20

Según esta estimación, el sitio probable de procesamiento de la subunidad amino correspondería con una arginina situada en la posición 136, eliminándose un pequeño péptido de secuencia HERGATVS. De manera similar, en la subunidad carboxilo existiría un péptido en la región carboxilo que se eliminaría (SGAL), cortándose la subunidad en una alanina en la posición 259.

Comparando la secuencia de las dos subunidades, se ha observado que son muy similares, compartiendo un 53 % de similitud (Figura 3.22).

Identities = 41/110 (37%), Positivos = 59/110 (53%), Huecos = 10/110 (9%)

```

Amino:      2  NVLLTGDVLHTDNQLSFESAAFVMQDCNLVLYNEAGG---FQSNTHGRGVGCTLTNNL 59
              NVL +  V+  + QL+      + VM+ DCNL L   +      ++S T GRG  C + L +
Carboxilo:  7  NVLFSSQVMSDNAQLATRDYSLVMRDDCNLALTKGSKTNIVWESGTSGRGQHC FMRLGHT 66

Amino:      60  GQLEIHSANSNTPVWVSPRNINTV--QGNYYAVLGPDPQHVITYGPAIWST 107
              G +EI      NT VW S      NTV +G+Y  +L  +      +YGPA+WST
Carboxilo:  67  GLIEISDDRLNT-VWRS---NTVGQEGDYVLILQINGQAVVYGPAVWST 111
  
```

FIGURA 3.22- Alineamiento mostrando la homología entre las subunidades amino y carboxilo de la lectina de corno de azafrán

Además se realizó la predicción de la estructura terciaria de la proteína (figura 3.23 A) mediante el programa SwissModel (Peitsch, 1995, 1996; Guex y Peitsch, 1997). Esta estructura consiste en tres agrupaciones de hojas plegadas β , siendo ambas subunidades muy similares. Las dos subunidades están unidas por una corta cadena de aminoácidos con estructura al azar. La predicción del potencial electrostático muestra una gran diferencia entre ambas subunidades (figura 3.23 B).

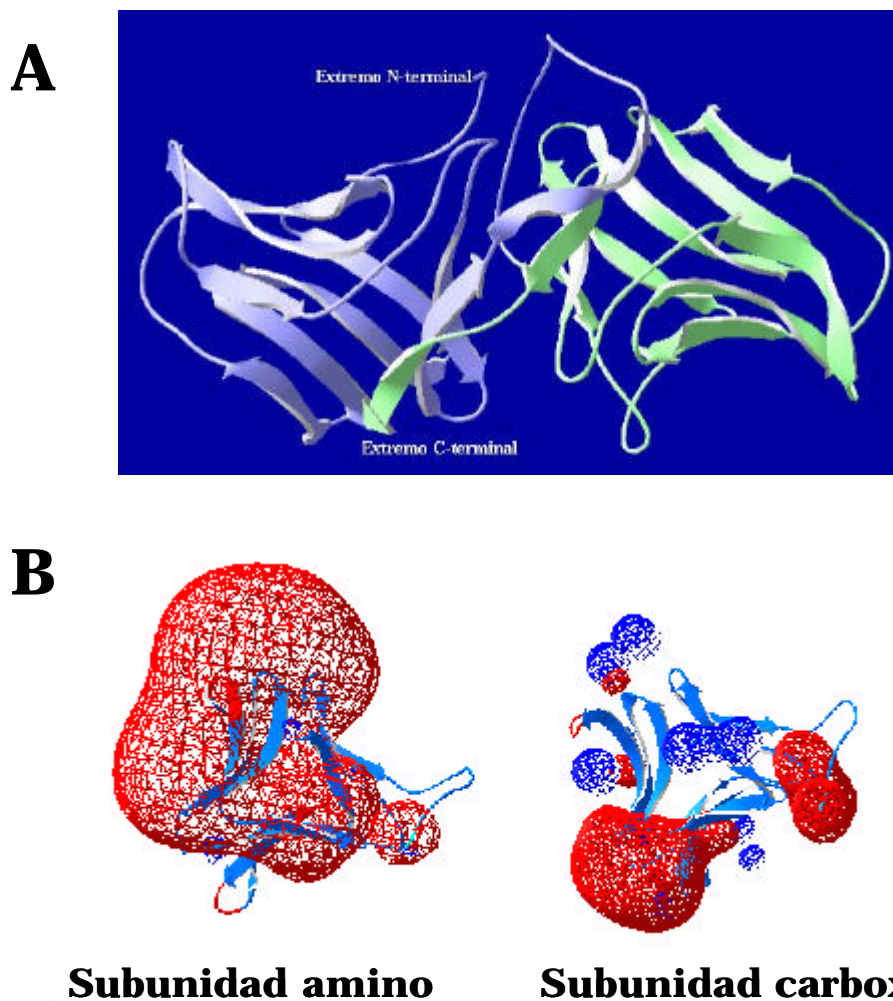


FIGURA 3.23.- A) Predicción de la estructura terciaria de la lectina de unión a manano de corno de azafrán. B) Predicción del potencial electrostático de las dos subunidades de las que se compone la lectina de corno de azafrán.

El 53 % de similitud entre ambas subunidades sugiere que el gen de la lectina proviene de la evolución por duplicación génica de un gen antecesor (Koike y col., 1995). Sin embargo, a pesar de la similitud encontrada en la secuencia de aminoácidos, ambas subunidades presentan grandes diferencias en su potencial electrostático, teniendo la subunidad amino una densidad de carga muy negativa, mientras que la subunidad carboxilo parece tener mayor densidad de carga positiva. Esta diferencia puede contribuir a la agrupación en tetrámeros (Escribano y col., 2000), que se produce mediante fuerzas débiles.

3.3.2.- Análisis de expresión

Se examinó la expresión del gen de la lectina en los diferentes tejidos de la planta de azafrán. Se realizó un ensayo mediante RT-PCR con los oligos de los extremos de la lectina de todos los tejidos de la planta, además de incluir tejido de callos indiferenciados y de un cormo obtenido mediante cultivo *in vitro*. Los resultados muestran que la lectina se está expresando únicamente en el cormo (figura 3.24), en el que se observó una banda del tamaño esperado, alrededor de 850 pb. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Escribano y col. (2000) en el que, mediante análisis de western-blot con anticuerpos policlonales sintetizados a partir de la proteína purificada, se vio que la proteína únicamente estaba presente en el cormo.

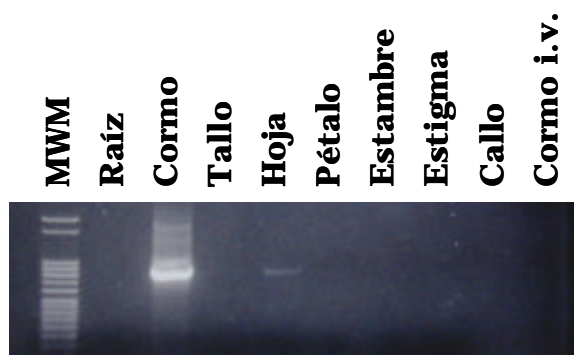


FIGURA 3.24.- RT-PCR de los distitntos tejidos de la planta de azafrán. El gen de la lectina únicamente se expresa en el cormo.

Para estudiar la acumulación de la lectina en el cormo de azafrán, en primer lugar se analizó la variación en la cantidad de proteína total en el cormo mediante un ensayo con reactivo de Bradford de todos los estadios durante los dos años que dura su desarrollo, desde el comienzo de la brotación hasta la senescencia. La proteína total se incrementa en el cormo a partir de los meses de enero-febrero (estadio C3), alcanzando su máximo en el estadio C4, durante los meses de verano (entre junio y septiembre), cayendo ésta a partir del mes de noviembre, en el que tiene lugar la floración (figura 3.25).

La acumulación de la lectina se ha estudiado mediante análisis de electroforesis en geles de poliacrilamida y Western blot, presentando un patrón similar a la acumulación de proteína total en el corno (Figura 3.26). En el estadio C1 aparece la lectina, pero únicamente dissociada en sus dos subunidades, pues no se aprecia la banda del precursor de 28 kDa.

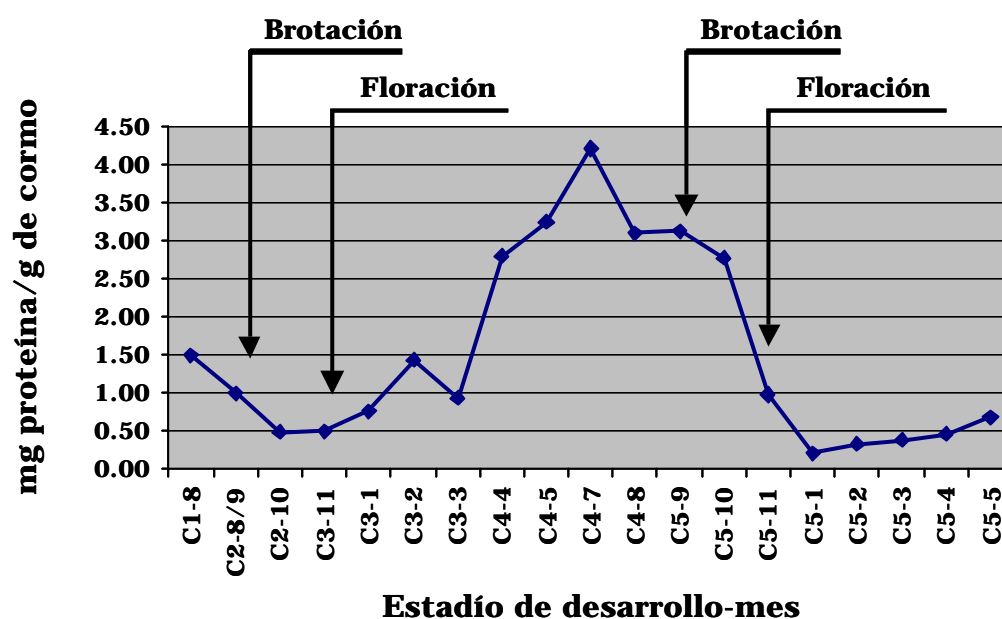


FIGURA 3.25.- acumulación de la proteína total en el corno de azafrán a lo largo de su desarrollo. Se indican los momentos de la brotación y la floración.

Se determinó el patrón de expresión de los dos mensajeros encontrados mediante el diseño de oligos específicos de cada uno, y amplificación por PCR a partir de ADNc de todos los estadios de desarrollo. A diferencia de lo que sucede en arroz, en el que los dos mensajeros encontrados presentan un diferente patrón temporal de expresión (Wilkins y Raikhel, 1989), en el azafrán no se observaron diferencias en cuanto a la expresión temporal de ambos mensajeros. La expresión de la lectina se mantiene en niveles bajos hasta los meses de febrero-

marzo, momento en el cual comienza a aumentar hasta alcanzar el máximo en los meses de verano (julio-agosto). A partir de septiembre, momento en el cual el azafrán ha comenzado su brotación, la expresión del gen de la lectina se puede considerar testimonial (Figura 3.26).

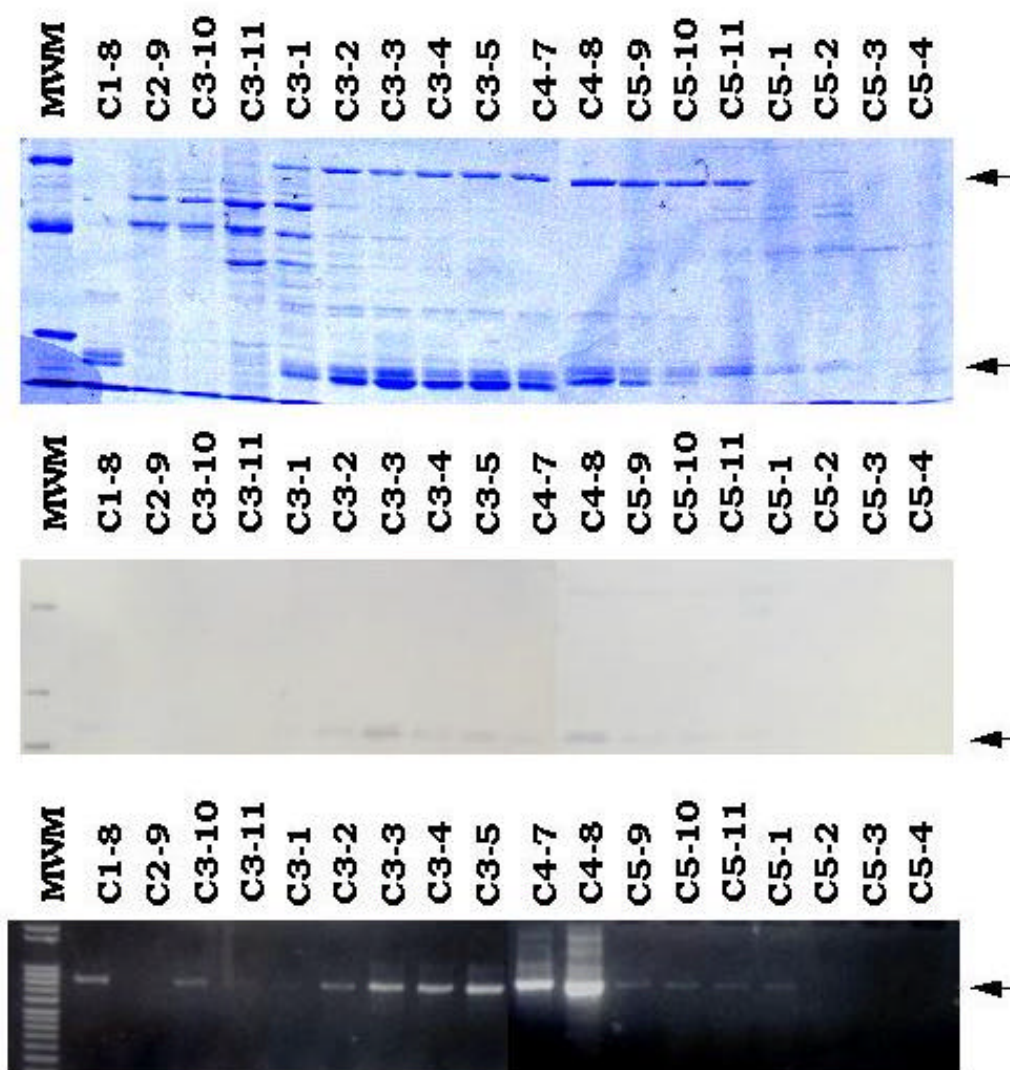


FIGURA 3.26.- SDS-PAGE, Western blot y RT-PCR de los distintos estadios de desarrollo del cormo de azafrán.

El patrón de acumulación de la proteína no parece concordar con el propuesto por de Castro y col. (1992) para la curculina de taro, proteína con un alto grado de similitud con la subunidad amino de la lectina de azafrán (Escribano y col., 2000). La curculina se ha sugerido que se

acumula durante los estadios más tempranos de desarrollo del cormo, mientras que la lectina de azafrán se expresa principalmente en el estadio C4.

La presencia de las bandas correspondientes a ambas subunidades, pero la ausencia del precursor en el estadio C1, sugiere, o bien que está siendo movilizada en forma de ambas subunidades, o bien que está siendo procesada más rápidamente para su utilización como fuente de aminoácidos para la brotación. La desaparición de la lectina en el mes de noviembre refuerza el papel de reserva de esta proteína, pues este es el momento en el que ha finalizado la floración. Además, es la proteína mayoritaria del cormo y el gen que codifica para la lectina se expresa únicamente en este órgano, como demuestran los resultados obtenidos mediante SDS-PAGE y RT-PCR para los distintos tejidos de la planta.

De los resultados obtenidos, puede deducirse la función de la lectina. Es una proteína que comienza a sintetizarse en febrero, en el estadio C3, expresándose en el cormo de manera creciente hasta el mes de agosto (estadio C4). En septiembre, cuando comienza la brotación, la lectina deja de expresarse, por lo que es posible que esta proteína, como las proteínas de reserva, proporcione los aminoácidos necesarios para que tenga lugar la brotación. Una vez concluida la floración (noviembre), la lectina desaparece del cormo, comenzando de nuevo su síntesis en febrero.

4.- CONCLUSIONES

- 1.- Se han definido seis estadios de desarrollo que abarcan el desarrollo completo del cormo, desde su aparición como yemas en estado latente hasta su senescencia, caracterizados por los procesos fisiológicos y ontogénicos que suceden en el cormo.
- 2.- Se aprecia una mayor actividad celular en el estadio C3 que en C4, por la aparición de un mayor número de secuencias con similitud con proteínas implicadas en síntesis, ensamblaje y degradación proteica, proteínas relacionadas con el crecimiento de la pared celular o proteínas implicadas en procesos de percepción y transducción de señales.
- 3.- En el estadio C3 han aparecido un porcentaje muy elevado de secuencias con similitud con proteínas relacionadas con defensa frente a patógenos y respuesta a estrés, poniendo de manifiesto las duras condiciones ambientales a las que se ve sometido el cormo.
- 4.- El transporte adquiere mayor importancia en el estadio C4 que en C3, probablemente debido a la distribución de los compuestos celulares hacia sus orgánulos previa a la brotación.
- 5.- En el estadio C3 han aparecido secuencias con similitud con enzimas implicadas en el metabolismo de carbohidratos, indicando que en este estadio se está produciendo acumulación de reservas. En el estadio C4 apareció la secuencia de la proteína mayoritaria de reserva.
- 6.- Un porcentaje elevado de secuencias de ambos estadios no mostraron similitud significativa, pudiendo corresponder a genes específicos del cormo o que se están expresando como respuesta a condiciones fisiológicas como la dormancia.
- 7.- Se ha obtenido la secuencia de la parte codificante del gen que codifica para la proteína de reserva mayoritaria, una lectina de unión a manano. Esta proteína se acumula en el cormo durante los meses de verano, en los que el cormo permanece durmiente y desaparece una vez que se ha producido la brotación y la floración.

5.- BIBLIOGRAFÍA

- Aalen RB, Opsahl-Ferstad HG, Linnestad C y Olsen OA. 1994. Transcripts encoding an oleosin and a dormancy-related protein are present in both the aleurone layer and the embryo of developing barley (*Hordeum vulgare* L.) seeds. *Plant J.* 5: 385-396.
- Aalen RB, Salehian Z y Steinum TM. 2001. Stability of barley aleurone transcripts: Dependence on protein synthesis, influence of the starchy endosperm and destabilization by GA3. *Physiol. Plant* 112: 403-413.
- Abdullaev FI. 1993. Biological effects of saffron. *Biofactors* 4: 83-86.
- Abdullaev FI. 1994. Inhibitory effect of crocetin on intracellular nucleic acid and protein synthesis in malignant cells. *Toxicol. Lett.* 70 :243-251.
- Abdullaev FI. 2002. Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of saffron (*Crocus sativus* L.). *Exp. Biol. Med.* 227: 20-25.
- Abdullaev FI y Frenkel GD. 1992. The effect of saffron on intracellular DNA, RNA and protein synthesis in malignant and non-malignant human cells. *Biofactors* 4: 43-45.
- Abe K y Saito H. 2000. Effects of saffron extract and its constituent crocin on learning behaviour and long-term potentiation. *Phytother. Res.* 14: 149-152.
- Adam ZA, Adamska I, Nakabayashi K, Ostersetzer O, Haussuhl K, Manuell A, Zheng B, Vallon O, Rodermel SR, Shinozaki K y Clarke AK. 2001. Chloroplast and Mitochondrial Proteases in Arabidopsis. A Proposed Nomenclature. *Plant Physiol.* 125: 1912-1918.
- Adrain C, Slee EA, Harte MT y Martin SJ. 1999. Regulation of apoptotic protease activating factor-1 oligomerization and

- apoptosis by the WD-40 repeat region. *J. Biol. Chem.* 274: 20855-20860.
- Ahn JH, Choi Y, Kwon YM, Kim SG, Choi YD y Lee JS. 1996. A Novel Extensin Gene Encoding a Hydroxyproline-Rich Glycoprotein Requires Sucrose for Its Wound-Inducible Expression in Transgenic Plants. *Plant Cell* 8: 1477-1490.
 - Ahuja A, Koul S, Ram G y Kaul BL. 1994. Somatic embryogenesis and regeneration of plantlets in saffron, *Crocus sativus* L. *Indian Journal of Experimental Botany* 32: 135-140.
 - Allona I, Quinn M, Shoop E, Swope K, St Cyr S, Carlis J, Riedl J, Retzel E, Campbell MM, Sederoff R y Whetten, RW. 1998. Analysis of xylem formation in pine by cDNA sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 9693-9698.
 - Alonso GL, Varón R, Navarro F y Gómez R. 1998. Algunos detalles históricos sobre el azafrán. *Ensayos*, 2: 223-230.
 - Asamizu E, Nakamura Y, Sato S y Tabata S. 2000a. Generation of 7137 non-redundant expressed sequence tags from a legume, *Lotus japonicus*. *DNA Res.* 7: 127-130.
 - Asamizu E, Nakamura Y, Sato S y Tabata S. 2000b. A large scale analysis of cDNA in *Arabidopsis thaliana*: generation of 12,028 non-redundant expressed sequence tags from normalized and size-selected cDNA libraries. *DNA Res.* 7: 175-180.
 - Ausubel F, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA y Struhl K. 1992. Short Protocols in Molecular Biology. 2ª ed. Green Publishing Associates and John Wiley & Sons. New York.
 - Azizbekova NSH, Milyaeva EL, Lobova NV y Chailakhyan MKH. 1978. Effects of gibberellin and kinetin on formation of flower organs in saffron crocus. *Fiziol. Rast.* 25: 603-609.
 - Baiges I, Schaffner AR, Affenzeller MJ y Mas A. 2002. Plant aquaporins. *Physiol. Plant* 115: 175-182.

- Basker D y Negbi M. 1983. The uses of saffron. *Economic Botany* 37: 228-236.
- Baumberger N, Ringli C y Keller B. 2001. The chimeric leucine-rich repeat/extensin cell wall protein LRX1 is required for root hair morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Gen. Dev.* 15: 1128-1139.
- Becker J y Craig EA. 1994. Heat-shock proteins as molecular chaperones. *Eur. J. Biochem.* 219: 11-23.
- Beckmann R, Bubeck D, Grassucci R, Penczek P, Verschoor A, Blobel G y Frank J. 1997. Alignment of Conduits for the Nascent Polypeptide Chain in the Ribosome-Sec61 Complex. *Science* 278: 2123-2126.
- Bednarek SY, Wilkins TA, Dombrowski JE y Raikhel NV. 1991. A Carboxyl-Terminal Propeptide Is Necessary for Proper Sorting of Barley Lectin to Vacuoles of Tobacco. *Plant Cell* 2: 1145-1155.
- Beguiristain T, Grandbastien MA, Puigdomènech P y Casacuberta JM. 2001. Three Tnt1 Subfamilies Show Different Stress-Associated Patterns of Expression in Tobacco. Consequences for Retrotransposon Control and Evolution in Plants. *Plant Physiol.* 127: 212-221.
- Behzad S, Razavi M y Mahareji M. 1992a. The effect of various amount of ammonium phosphate and urea on saffron production. *Acta Horticulturae* 306: 337-339.
- Behzad S, Razavi M y Mahareji M. 1992b. The effect of mineral nutrients (N.P.K.) on saffron production. *Acta Horticulturae* 306: 426-430.
- Benedict MA, Hu Y, Inohara N y Nunez G. 2000. Expression and functional analysis of Apaf-1 isoforms. Extra Wd-40 repeat is required for cytochrome c binding and regulated activation of procaspase-9. *J. Biol. Chem.* 275: 8461-8468.

- Bennetzen JL. 1996. The contributions of retroelements to plant genome organization, function and evolution. *Trends Microbiol.* 4: 347-353.
- Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Rapp BA y Wheeler DL. 2002. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 30: 17-20.
- Berger D y Altmann T. 2000. A subtilisine-like serine protease involved in the regulation of stomatal density and distribution in *Arabidopsis thaliana*. *Gen. Dev.* 14: 1119-1131.
- Berrocal-Lobo M, Segura A, Moreno M, López G, García-Olmedo F y Molina A. 2002. Snakin-2, an Antimicrobial Peptide from Potato Whose Gene Is Locally Induced by Wounding and Responds to Pathogen Infection. *Plant Physiol.* 128: 951-961.
- Bezerra IC, de Castro LAB, Neshich G y de Almeida ERP. 1995. A corm-specific gene encodes tarin, a major globulin of taro (*Colocasia esculenta* Schott). *Plant Mol. Biol.* 28: 137-144.
- Bouchez D y Höfte H. 1998. Functional Genomics in Plants. *Plant Physiol* 118: 725-732.
- Boston RS, Viitanen PV y Vierling E. 1996. Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant Mol. Biol.* 32: 191-222.
- Botella O, de Juan JA, Muñoz MR, Moya A y López H. 2002. Descripción morfológica y ciclo anual del azafrán (*Crocus sativus* L.). *Cuadernos de Fitopatología* 1er trimestre 2002: 18-28.
- Boudonck K, Dolan L y Shaw PJ. 1998. Coiled body numbers in the *Arabidopsis* root epidermis are regulated by cell type, developmental stage and cell cycle parameters. *J. Cell Sci.* 111: 3687-3694.
- Bowman JL. 2000. The YABBY gene family and abaxial cell fate. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 17-22.

- Brandizzi F y Grilli Caiola M. 1996. Quantitative DNA analysis in different *Crocus* species (Iridaceae) by means of flow cytometry. *Giornale Botanico Italiano* 130: 643-645.
- Bray EA, Bailey-Serres J y Weretilnyk E. 2000. Responses to Abiotic Stresses. En *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Ed. Bob B. Buchanan, Wilhelm Gruissem y Russell L. Jones. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland.
- Burke RM y Cairney JW. 2002. Laccases and other polyphenol oxidases in ecto- and ericoid mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 12: 105-116.
- Caderas D, Muster M, Vogler H, Mandel T, Rose JKC, McQueen-Mason S y Kuhlemeier C. 2000. Limited Correlation between Expansin Gene Expression and Elongation Growth Rate. *Plant Physiol.* 123: 1399-1413.
- Cai H, Wang CC y Tsou CL. 1994. Chaperone-like Activity of Protein Disulfide Isomerase in the Refolding of a Protein with No Disulfide Bonds. *J. Biol. Chem.* 269: 24550-24552.
- Callard D, Axelos M y Mazzolini L. 1996. Novel molecular markers for late phases of the growth cycle of *Arabidopsis thaliana* cell-suspension cultures are expressed during organ senescence. *Plant Physiol.* 112: 705-715.
- Capelli C, Buonauro R y Polverari A. 1991. Occurrence of *Penicillium corymbiferum* on saffron in Italy. *Plant Pathology* 40: 148-149.
- Carpita N y McCann M. 2000. The Cell Wall. En *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Ed. Bob B. Buchanan, Wilhelm Gruissem y Russell L. Jones. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland.
- Chanson A. 1990. Use of the pyrophosphatase activity as a reliable tonoplast marker in maize roots. *Plant Sci.* 71: 199-207.

- Chichiriccò G. 1987. Megasporogenesis and development of embryo sac in *Crocus sativus* L. *Caryologia* 40: 59-69.
- Chichiriccò G. 1989. Microsporogenesis and pollen development in *Crocus sativus* L. *Caryologia* 42: 237-249.
- Chichiriccò G y Grilli Caiola M. 1984. *Crocus sativus* pollen tube growth in intra- and interspecific pollinations. *Caryologia* 37: 115-125.
- Cho HT y Cosgrove DJ. 2000. Altered expression of expansin modulates leaf growth and pedicel abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 9783-9788.
- Chriqui D, D'Orazi D y Bagni N. 1986. Ornithine and arginine decarboxylases and polyamine involvement during *in vivo* differentiation of *Datura innoxia* leaf explant. *Physiol. Plant.* 68: 589-596.
- Chrispeels MJ y Raikhel NV. 1991. Lectins, Lectin Genes, and Their Role in Plant Defense. *Plant Cell* 3: 1-9.
- Chrungoo NK y Farooq S. 1984. Influence of gibberellic acid and naphthaleneacetic acid on the yield of saffron and on growth in saffron crocus (*Crocus sativus* L.). *Indian J. Plant Physiol.* 27: 201-205.
- Chrungoo NK y Farooq S. 1989. Influence of GA₃ and NAA on certain carbohydrate fractions in corms of saffron crocus (*Crocus sativus* L.) during development. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 58: 237-246.
- Chrungoo NK, Koul KK y Farooq S. 1983. Carbohydrate changes in corms of saffron crocus (*Crocus sativus* L.) during dormancy and sprouting. *Trop. Plant Sci. Res.* 1 (4): 295-298.
- Cobbett C y Goldsbrough P. 2002. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53:159-182.

- Conlan RS, Griffiths LA, Napier JA, Shewry PR, Mantell S y Ainsworth C. 1995. Isolation and characterisation of cDNA clones representing the genes encoding the major tuber storage protein (dioscorin) of yam (*Dioscorea cayenensis* Lam.). *Plant Mol. Biol.* 28: 369-380.
- Dangl JL, Dietrich RA y Thomas H. 2000. Senescence and Programmed Cell Death. En *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Ed. Bob B. Buchanan, Wilhelm Gruissem y Russell L. Jones. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland.
- de Castro LAB, Carneiro M, Neshich DCM y de Paiva GR. 1992. Spatial and temporal gene expression patterns occur during corm development. *Plant Cell* 4: 1549-1559.
- DeLille JM, Sehnke PC y Ferl RJ. 2001. The Arabidopsis 14-3-3 Family of Signaling Regulators. *Plant Physiol.* 126: 35-38.
- Dellaporta SL, Wood J y Hicks JB. 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1: 19-21.
- de Mastro G y Ruta C. 1993. Relations between corm size and saffron (*Crocus sativus* L.) flowering. *Acta Horticulturae* 344: 512-517.
- Dennis DT y Blakeley SD. 2000. Carbohydrate Metabolism. En *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Ed. Bob B. Buchanan, Wilhelm Gruissem y Russell L. Jones. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland.
- Díaz-Perales A, García-Casado G, Sánchez-Monge R, García-Selles FJ, Barber D y Salcedo G. 2002a. cDNA cloning and heterologous expression of the major allergens from peach and apple belonging to the lipid-transfer protein family. *Clin. Exp. Allergy* 32: 87-92.

- Díaz-Perales A, Tabar AI, Sánchez-Monge R, García BE, Gómez B, Barber D y Salcedo G. 2002b. Characterization of asparagus allergens: a relevant role of lipid transfer proteins. *J. Allergy Clin. Immunol.* 110:790-796.
- Di Laurenzio L, Wysocka-Diller J, Malamy JE, Pysh L, Helariutta Y, Freshour G, Hahn MG, Feldmann KA y Benfey PN. 1996. The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the Arabidopsis root. *Cell* 86: 423-433.
- Diefenbach J y Kindl H. 2000. The membrane-bound DnaJ protein located at the cytosolic site of glyoxysomes specifically binds the cytosolic isoform 1 of Hsp70 but not other Hsp70 species. *Eur. J. Biochem.* 267: 746-754.
- Ding CK, Wang CY, Gross KC y Smith DL. 2002. Jasmonate and salicylate induce the expression of pathogenesis-related-protein genes and increase resistance to chilling injury in tomato fruit. *Planta* 214: 895-901.
- Domon C, Lorkovic ZJ, Valcárcel J y Filipowicz W. 1998. Multiple Forms of the U2 Small Nuclear Ribonucleoprotein Auxiliary Factor U2AF Subunits Expressed in Higher Plants. *J. Biol. Chem.* 273: 34603-34610.
- Donaldson JG. 2000. Filling the GAPs in the ADP-ribosylation factor story. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 3792-3794.
- El-Gendy W, Brownleader MD, Ismail H, Clarke PJ, Gilbert J, El-Bordiny F, Trevan M, Hopkins J, Naldrett M y Jackson P. 2001. Rapid deposition of wheat cell wall structural proteins in response to *Fusarium*-derived elicitors. *J. Exp. Bot* 54: 85-90.
- Endo M, Kokubun T, Takahata Y, Higashitani A, Tabata S y Watanabe M. 2000. Analysis of expressed sequence tags of flower buds in *Lotus japonicus*. *DNA Res.* 7: 213-216.

- Escribano J, Alonso GL, Coca-Prados M y Fernández JA. 1996. Crocin, safranal and picrocrocin from saffron (*Crocus sativus* L.) inhibit the growth of human cancer cells in vitro. *Cancer Lett.* 100: 23-30.
- Escribano J, Ríos I y Fernández JA. 1999a. Isolation and cytotoxic properties of a novel proteoglycan from corms of saffron plant (*Crocus sativus* L.). *Biochem. Biophys. Acta* 1426: 217-222.
- Escribano J, Piqueras A, Medina J, Rubio A, Alvarez-Ortí M y Fernández JA. 1999b. Production of a cytotoxic proteoglycan using callus culture of saffron corms (*Crocus sativus* L.). *J. Biotechnol.* 73: 53-59.
- Escribano J, Díaz-Guerra MJM, Riese HH, Álvarez A, Proenza R y Fernández JA. 1999c. The selective cytolytic effect of a proteoglycan isolated from corms of saffron plant on human cell lines in culture. *Planta Med.* 66: 157-162.
- Escribano J, Díaz-Guerra MJM, Riese HH, Ontañón J, García-Olmo DC, Rubio A y Fernández JA. 1999d. In vitro activation of macrophages by a novel proteoglycan isolated from corms of *Crocus sativus* L. *Cancer Lett.* 144: 107-114.
- Escribano J, Rubio A, Alvarez-Ortí M, Molina A y Fernández JA. 2000. Purification and characterization of a mannan-binding lectin specifically expressed in corms of saffron plant (*Crocus sativus* L.). *J. Agric. Food Chem.* 48: 457-463.
- Eshed Y, Baum SF, Perea JV y Bowman JL. 2001. Establishment of polarity in lateral organs of plants. *Curr. Biol.* 11: 1251-1260.
- Farooq S, Koul KK y Chrungoo NK. 1985. Composition of the Corms and Foliage of Saffron *Crocus sativus* L.) with particular Reference to Starch Quality and Content in Corms. *J. Econ. Tax. Bot.* 6: 485-489.

- Feo F, Martínez J, Martínez A, Galindo PA, Cruz A, García R, Guerra F y Palacios R. 1997. Occupational allergy in saffron workers. *Allergy* 52: 633-641.
- Fernández JA y Escribano J. 2000. Biotecnología del azafrán. Ediciones de la Universidad de Castilla-La Mancha, Cuenca.
- Fernández JA, Escribano J, Piqueras A y Medina J. 2000. A glycoconjugate from corms of saffron plant (*Crocus sativus* L.) inhibits root growth and affects in vitro cell viability. *J. Exp. Bot* 345: 731-737.
- Fink AL. 1999. Chaperone-Mediated Protein Folding. *Physiol. Rev.* 79: 425-449.
- Flavell AJ, Dunbar E, Anderson R, Pearce SR, Hartley R y Kumar A. 1992. Ty1-copia group retrotransposons are ubiquitous and heterogeneous in higher plants. *Nucl. Acids Res.* 20: 3639-3644.
- Flavell AJ, Pearce SR, Heslop-Harrison P y Kumar A. 1997. The evolution of Ty1-copia group retrotransposons in eukaryote genomes. *Genetica* 100: 185-195.
- Fliegmann J y Sandermann Jr. H. 1997. Maize glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase cDNA: a novel plant gene of detoxification. *Plant Mol. Biol.* 34: 843-854.
- Florack DE y Stiekema WJ. 1994. Thionins: properties, possible biological roles and mechanisms of action. *Plant Mol. Biol.* 26: 25-37.
- Frugis G, Mele G, Giannino D, Mariotti D. 1999. MsJ1, an alfalfa DnaJ-like gene, is tissue-specific and transcriptionally regulated during cell cycle. *Plant Mol. Biol.* 40: 397-408.
- Gallardo M, Bueno M, Angosto T, Gallardo E y Matilla AJ. 1992. Free polyamines in *Cicer arietinum* seeds during the onset of germination. *Phytochemistry* 31 (7): 2283-2287.

- Galván A y Fernández E. 2001. Eukaryotic nitrate and nitrite transporters. *Cell Mol. Life Sci.* 58: 225-233.
- García-Hernández M, Murphy A y Taiz L. 1998. Metallothioneins 1 and 2 Have Distinct but Overlapping Expression Patterns in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 118: 387-397.
- García-Higuera I, Fenoglio J, Li Y, Lewis C, Panchenko MP, Reiner O, Smith TF y Neer EJ. 1996. Folding of proteins with WD-repeats: comparison of six members of the WD-repeat superfamily to the G protein beta subunit. *Biochemistry* 35: 13985-13994.
- Garg AK, Kim JK, Owens TG, Ranwala AP, Choi YD, Kochian LV y Wu RJ. 2002. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:15898-15903.
- Gasser CS, Gunning DA, Budelier KA y Brown SM. 1990. Structure and expression of cytosolic cyclophilin/peptidyl-prolyl cis-trans isomerase of higher plants and production of active tomato cyclophilin in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 9519-9523.
- Giese M, Bauer-Doranth U, Langebartels C y Sandermann Jr. H. 1994. Detoxification of Formaldehyde by the Spider Plant (*Chlorophytum comosum* L.) and the Soybean (*Glycine max* L.) Cell-Suspension Cultures. *Plant Physiol.* 104: 1301-1309.
- Gijzen M, Kuflu K, Qutob D y Chernys JT. 2001. A class I chitinase from soybean seed coat. *J. Exp. Bot.* 52: 2283-2289.
- Gilbert HF. 1997. Protein Disulfide Isomerase and Assisted Protein Folding. *J. Biol. Chem.* 272: 29399-29402.
- Giritch A, Ganai M, Stephan UW y Baumlein H. 1998. Structure, expression and chromosomal localisation of the metallothionein-like gene family of tomato. *Plant Mol. Biol.* 37: 701-714.

- Goddijn O y Smeekens S. 1998. Sensing trehalose biosynthesis in plants. *Plant J.* 14: 143-146.
- Goddijn OJ y van Dun K. 1999. Trehalose metabolism in plants. *Trends Plant Sci.* 4: 315-319.
- Goldman RD, Gruenbaum Y, Moir RD, Shumaker DK y Spann, TP. 2002. Nuclear lamins: building blocks of nuclear architecture. *Gen. Dev.* 16: 533-547.
- Goossens A, Geremia R, Bauw G, Van Montagu M y Angenon G. 1994. Isolation and characterization of arcelin-5 proteins and cDNAs. *Eur. J. Biochem.* 225: 787-795.
- Grandbastien MA. 1998. Activation of plant retrotransposons under stress conditions. *Trends Plant Sci.* 3: 181-187.
- Greenfield JJA y High S. 1999. The Sec61 complex is located in both the ER and the ER-Golgi intermediate compartment. *J. Cell Sci.* 112: 1477-1486.
- Grilli Caiola M. 1999. Reproduction Biology of Saffron and its Allies. En *Saffron: Crocus sativus L.* Ed. Harwood Academic Publishers, Singapore.
- Grilli Caiola M y Chichiriccò G. 1991. Structural organization of the pistil in saffron (*Crocus sativus L.*). *Israel Journal of Botany* 40: 199-207.
- Guex N y Peitsch MC. 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis* 18: 2714-2723.
- Guy CL y Li QB. 1998. The Organization and Evolution of the Spinach Stress 70 Molecular Chaperone Gene Family. *Plant Cell* 10: 539-556.
- Hall JL. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Bot* 53: 1-11.

- Hammond-Kosack K y Jones JDG. 2000. Responses to Plant Pathogens. En *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Ed. Bob B. Buchanan, Wilhelm Gruissem y Russell L. Jones. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland.
- Harada JJ, Spadaro-Tank J, Maxwell JC, Schnell DJ y Etzler ME. 1990. Two Lectin Genes Differentially Expressed in *Dolichos biflorus* Differ Primarily by a 116-Base Pair Sequence in Their 5' Flanking Regions. *J. Biol. Chem.* 265: 4997-5001.
- Herman EM y Larkins BA. 1999. Protein Storage Bodies and Vacuoles. *Plant Cell* 11, 601-613.
- Heslop-Harrison JS, Brandes A, Taketa S, Schmidt T, Vershinin AV, Alkhimova EG, Kamm A, Doudrick RL, Schwarzacher T, Katsiotis A, Kubis S, Kumar A, Pearce SR, Flavell AJ, Harrison GE. 1997. The chromosomal distribution of Ty1-copia group retrotransposable elements in higher plants and their implications for genome evolution. *Genetica* 100: 197-204.
- Hirai M, Nakamura K, Imai T y Sato T. 1993. cDNAs encoding for storage proteins in the tubers of taro (*Colocasia esculenta* Schott). *Jpn. J. Genet* 68: 229-236.
- Hirochika H, Sugimoto K, Otsuki Y, Tsugawa H y Kanda M. 1996. Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 7783-7788.
- Horibe T, Yoshio C, Okada S, Tsukamoto M, Nagai H, Hagiwara Y, Tujimoto Y y Kikuchi M. 2002. The chaperone activity of protein disulfide isomerase is affected by cyclophilin B and cyclosporin a in vitro. *J. Biochem. (Tokyo)* 132: 401-407.
- Hoshijima K, Metherall JE y Grunwald DJ. 2002. A protein disulfide isomerase expressed in the embryonic midline is required for left/right asymmetries. *Genes Dev.* 16: 2518-2529.

- Houry WA. 2001. Chaperone-assisted protein folding in the cell cytoplasm. *Curr. Protein Pept. Sci.* 2: 227-244.
- Huang H y Villanueva RV. 1992. Inhibition of polyamine biosynthesis and seed germination *Picea abies*. *Phytochemistry* 31 (10): 3353-3356.
- Hughes M, Zhang C, Avis JM, Hutchinson CJ y Clarke PR. 1998. The role of the Ran GTPase in nuclear assembly and DNA replication: characterisation of the effects of Ran mutants. *J. Cell Sci.* 111: 3017-3026.
- Huttermann A, Mai C y Kharazipour A. 2001. Modification of lignins for the production of new compounded materials. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55: 387-394.
- Huynh QK, Hironaka CM, Levine EB, Smith CE, Borgmeyer JR y Shah DM. 1992. Antifungal Proteins from Plants. Purification, Molecular Cloning, and Antifungal Properties of Chitinases from Maize Seeds. *J. Biol. Chem.* 267: 6635-6640.
- Ingram J y Bartels D. 1996. The Molecular Basis of Dehydration Tolerance in Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 47: 377-403.
- Ishida S, Takahashi Y y Nagata T. 1993. Isolation of cDNA of an auxin-regulated gene encoding a G protein β subunit-like protein from tobacco BY-2 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 11152-11156.
- Jackson PAP, Galinha CIR, Pereira CS, Fortunato A, Soares NC, Amâncio SBQ y Pinto Ricardo CP. 2001. Rapid Deposition of Extensin during the Elicitation of Grapevine Callus Cultures Is Specifically Catalyzed by a 40-Kilodalton Peroxidase. *Plant Physiol.* 127: 1065-1076.

- James JT y Dubery IA. 2001. Inhibition of polygalacturonase from *Verticillium dahliae* by a polygalacturonase inhibiting protein from cotton. *Phytochemistry* 57: 149-156.
- Jang IC, Oh SJ, Seo JS, Choi WB, Song SI, Kim CH, Kim YS, Seo HS, Choi YD, Nahm BH y Kim JK. 2003. Expression of a Bifunctional Fusion of the *Escherichia coli* Genes for Trehalose-6-Phosphate Synthase and Trehalose-6-Phosphate Phosphatase in Transgenic Rice Plants Increases Trehalose Accumulation and Abiotic Stress Tolerance without Stunting Growth. *Plant Physiol.* 131: 516-524.
- Javot H y Maurel C. 2002. The role of aquaporins in root water uptake. *Ann. Bot. (Lond.)* 90: 301-313.
- Jiang L y Rogers JC. 1998. Integral Membrane Protein Sorting to Vacuoles in Plant Cells: Evidence for Two Pathways. *J. Cell Biol.* 143: 1183-1199.
- Jirage DB, Ravishankar GA, Suvarnalatha G y Venkataraman LV. 1994. Profile of Polyamines During Sprouting and Growth of Saffron (*Crocus sativus* L.) Corms. *J. Plant Growth Regul.* 13: 69-72.
- Jordá L, Coego A, Conejero V y Vera P. 1999. A Genomic Cluster Containing Four Differentially Regulated Subtilisin-like Processing Protease Genes Is in Tomato Plants. *J. Biol. Chem.* 274: 2360-2365.
- Jordá L, Conejero V y Vera P. 2000. Characterization of *P69E* and *P69F*, Two Differentially Regulated Genes Encoding New Members of the Subtilisin-Like Proteinase Family from Tomato Plants. *Plant Physiol.* 122: 67-73.
- Jordá L y Vera P. 2000. Local and Systemic Induction of Two Defense-Related Subtilisin-Like Protease Promoters in Transgenic *Arabidopsis* Plants. Luciferin Induction of *PR* Gene Expression. *Plant Physiol.* 124: 1049-1057.

- Jordan ET y Goldstein IJ. 1994. The Sequence of a Second Member of the Lima Bean Lectin Gene Family and the Expression and Characterization of Recombinant Lectin in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 269: 7674-7681.
- Josefsson LG, Lenman M, Ericson ML y Rask L. 1987. Structure of a Gene Encoding the 1.7 S Storage Protein, Napin, from *Brassica napus*. *J. Biol. Chem.* 25: 12196-12201.
- Jungnickel B, Rapoport TA, Hartmann E. 1994. Protein translocation: common themes from bacteria to man. *FEBS Lett.* 346: 73-77.
- Kalendar R, Tanskanen J, Immonen S, Nevo E y Schulman AH. 2000. Genome evolution of wild barley (*Hordeum spontaneum*) by *BARE-1* retrotransposon dynamics in response to sharp microclimatic divergence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 6603-6607.
- Kandasamy MK, McKinney EC y Meagher RB. 2002. Plant profiling isovariants are distinctly regulated in vegetative and reproductive tissues. *Cell Motil. Cytoskeleton* 52: 22-32.
- Kaur-Sawhney R, Shih L y Galston AW. 1982. Relation of polyamine biosynthesis to the initiation of sprouting in potato tubers. *Plant Physiol.* 69: 411-415.
- Kidwell MG y Lisch D. 1997. Transposable elements as sources of variation in animals and plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 7704-7711.
- Kim M, Jung Y, Lee K y Kim C. 2000. Identification of the calcium binding sites in translationally controlled tumor protein. *Arch. Pharm. Res.* 23: 633-636.
- Kim YS, Park JY, Kim KS, Ko MK, Cheong SJ y Oh BJ. 2002a A thaumatin-like gene in nonclimacteric pepper fruits used as

- molecular marker in probing disease resistance, ripening, and sugar accumulation. *Plant Mol. Biol.* 49: 125-135.
- Kim SY, Sharma S, Hoskins JR, Wickner S. 2002b. Interaction of the DnaK and DnaJ chaperone system with a native substrate, P1 RepA. *J. Biol. Chem.* 277: 44778-44783.
 - Kirsch T, Paris N, Butler JM, Beevers L y Rogers JC. 1994. Purification and initial characterization of a potential plant vacuolar targeting receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 3403-3407.
 - Koike T, Titani K, Suzuki M, Beppu H, Kuzuya H, Maruta K, Shimpo K y Fujita K. 1995. The complete amino acid sequence of a mannose-binding lectin from “Kidachi aloe” (*Aloe arborescens* Miller ver. *natalensis* Berger). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 214 (1): 163-170.
 - Kumar A, Pearce SR, McLean K, Harrison G, Heslop-Harrison JS, Waugh R y Flavell AJ. 1997. The Ty1-copia group of retrotransposons in plants: genomic organisation, evolution, and use as molecular markers. *Genetica* 100: 205-217.
 - Kumar A y Bennetzen JL. 1999. Plant Retrotransposons. *Annu. Rev. Genet.* 33: 479-532.
 - Kumaran MK, Bowman JL y Sundaresan V. 2002. YABBY Polarity Genes Mediate the Represión of KNOX Homeobox Genes in Arabidopsis. *Plant Cell* 14: 2761-2770.
 - Kuwabara C, Takezawa D, Shimada T, Hamada T, Fujikawa S y Arakawa K. 2002. Absciscic acid- and cold-induced thaumatin-like protein in winter wheat has an antifungal activity against snow mould, *Microdochium nivale*. *Physiol. Plant* 115: 101-110.
 - Lee MH, Min MK, Lee YJ, Jin JB, Shin DH, Kim DH, Lee KH, y Hwang I. 2002. ADP-Ribosylation Factor 1 of *Arabidopsis* Plays a Critical Role in Intracellular Trafficking and Maintenance of

Endoplasmic Reticulum Morphology in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 129: 1507-1520.

- Leonowicz A, Cho NS, Luterek J, Wilkolazka A, Wojtas-Wasilewska M, Matuszewska A, Hofrichter M, Wesenberg D y Rogalski J. 2001. Fungal laccase: properties and activity on lignin. *J. Basic Microbiol.* 41: 185-227.
- Li L y Steffens JC. 2002. Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. *Planta* 215: 239-247.
- Li QB, Haskell DW y Guy CL. 1999. Coordinate and non-coordinate expression of the stress 70 family and other molecular chaperones at high and low temperature in spinach and tomato. *Plant Mol. Biol.* 39: 21-34.
- Li Y, DeFatta R, Anthony C, Sunavala G y De Benedetti A. 2001. A translationally regulated Tousled kinase phosphorylates histone H3 and confers radioresistance when overexpressed. *Oncogene* 20: 726-738.
- Liakopoulou-Kyriakides M, Sinakos Z y Kyriakides DA. 1985. A high molecular plaquelet aggregation inducer and inhibitor isolated from *Crocus sativus*. *Plant Science* 40: 117-120.
- Liakopoulou-Kyriakides M y Skubas AI. 1990. Characterization of the plaquelet aggregation inducer and inhibitor isolated from *Crocus sativus*. *Biochem. Int* 22: 103-110.
- Lim JY, Shin CS, Chung EJ, Kim HU, Oh SJ, Choi WB, Ryou CS, Kim JB, Kwon MS, Chung TY, Song SI, Kim JK, Nahm BH, Hwang YS, Eun MY, Lee JS, Cheong JJ y Choi YD. 2000. Analysis of expressed sequence tags from *Brassica rapa* ssp. *pekinensis*. *Mol Cells* 10: 399-404.
- Liu P, Goh CJ, Loh CS y Pua EC. 2002. Differential expression and characterization of three metallothionein-like genes in

- Cavendish banana (*Musa acuminata*). *Physiol. Plant* 114: 241-250.
- Lounsbury KM, Richards SA, Carey KL y Macara IG. 1996. Mutations within the Ran/TC4 GTPase. Effects on Regulatory Factor Interactions and Subcellular Localization. *J. Biol. Chem.* 271: 32834-32831.
 - Lu J, Weeden NF y LaRue TA. 1994. Chromosomal Location of Lectin Genes Indicates They Are Not the Basis of *Rhizobium* Strain Specificity Mutations Identified in Pea (*Pisum sativum* L.). *J. Hered.* 85: 179-182.
 - Maeshima M, Hara-Nishimura I, Takeuchi Y y Nishimura M. 1994. Accumulation of Vacuolar H⁺-Pyrophosphatase and H⁺-ATPase during Reformation of the Central Vacuole in Germinating Pumpkin Seeds. *Plant Physiol.* 106: 61-69.
 - Maldonado AM, Doerner P, Dixon RA, Lamb CJ y Cameron RK. 2002. A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in *Arabidopsis*. *Nature* 419: 399-403.
 - Masuda K, Xu ZJ, Takahashi S, Ito A, Ono M, Nomura K y Inoue M. 1997. Peripheral framework of carrot cell nucleus contains a novel protein predicted to exhibit a long alpha-helical domain. *Exp. Cell Res.* 232: 173-181.
 - Masuda K, Haruyama S y Fujino K. 1999. Assembly and disassembly of the peripheral architecture of the plant cell nucleus during mitosis. *Planta* 210: 165-167.
 - Mathew B. 1982. The *Crocus*. A Revision of the Genus *Crocus*. Batsford. London
 - Mathew B. 1999. Botany, Taxonomy and Cytology of *C. sativus* L. and its Allies. En *Saffron: Crocus sativus* L. Ed. Harwood Academic Publishers, Singapore.

- Maurel C, Javot H, Lauvergeat V, Gerbeau P, Tournaire C, Santoni V y Heyes J. 2002. Molecular physiology of aquaporins in plants. *Int. Rev. Cytol.* 215: 105-148.
- Mayer AM y Staples RC. 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* 60: 551-565.
- McCurdy DW, Kovar DR y Staiger CJ. 2001. Actin and actin-binding proteins in higher plants. *Protoplasma* 215: 89-104.
- McDougall GJ. 2000. A comparison of proteins from the developing xylem of compression and non-compression wood of branches of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) reveals a differentially expressed laccase. *J. Exp. Bot.* 51: 1395-1401.
- McKinney EC, Kandasamy MK y Meagher RB. 2001. Small changes in the regulation of one *Arabidopsis* profiling isovariant, PRF1, alter seedling development. *Plant Cell* 13: 1179-1191.
- McNulty AK y Saunders MJ. 1992. Purification and immunological detection of pea nuclear intermediate filaments: evidence for plant nuclear lamins. *J. Cell Sci.* 103: 407-414.
- Méndez E, Moreno A, Colilla F, Peláez F, Limas GG, Méndez R, Soriano F, Salinas M y de Haro C. 1990. Primary structure and inhibition of protein synthesis in eukaryotic cell-free system of a novel thionin, gamma-hordothionin, from barley endosperm. *Eur. J. Biochem.* 194, 533-539.
- Merkouropoulos G, Barnett DC y Shirsat AH. 1999. The *Arabidopsis* extensin gene is developmentally regulated, is induced by wounding, methyl jasmonate, abscisic and salicylic acid, and codes for a protein with unusual motifs. *Planta* 208: 212-219.
- Mhiri C, Morel JB, Vernhettes S, Casacuberta JM, Lucas H y Grandbastien MA. 1997. The promoter of the tobacco Tnt1

- retrotransposon is induced by wounding and by abiotic stress. *Plant Mol. Biol.* 33: 257-266.
- Mínguez A y Moreno Díaz de la Espina S. 1993. Immunological characterization of lamins in the nuclear matrix of onion cells. *J. Cell Sci.* 106: 431-439.
 - Mittler R, Herr EH, Orvar BL, van Camp W, Willekens H, Inzé D y Ellis BE. 1999. Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hyperresponsive to pathogen infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 14165-14170.
 - Moriguchi T, Kita M, Hisada S, Endo-Inagaki T y Omura M. Characterization of gene repertoires at mature stage of citrus fruits through random sequencing and analysis of redundant metallothionein-like genes expressed during fruit development. *Gene* 211: 221-227.
 - Morimoto S, Umezaki Y, Shoyama Y, Saito H, Nishi K y Irino N. 1994. Post-harvest degradation of carotenoid glucose esters in saffron. *Planta Med.* 60: 438-440.
 - Mourrain P, Beclin C, Elmayan T, Feuerbach F, Godon C, Morel JB, Jouette D, Lacombe AM, Nikic S, Picault N, Remoue K, Sanial M, Vo TA y Vaucheret H. 2000. *Arabidopsis* SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* 101: 533-542.
 - Moya A y González F. 2000. La bioinformática y la conservación de los recursos genéticos. En *Los Marcadores Genéticos en la Mejora Vegetal*. Ed. F. Nuez y J.M. Carrillo. Editorial de la UPV. Valencia.
 - Muntz K. 1998. Deposition of storage proteins. *Plant Mol. Biol.* 38: 77-99.
 - Nair SC, Pannikar B y Panikkar KR. 1991. Antitumour activity of saffron (*Crocus sativus*). *Cancer Lett.* 57: 109-114.

- Nair SC, Kurumboor SK y Hasegawa JH. 1995. Saffron chemoprevention in biology and medicine: a review. *Cancer Biother.* 10: 257-264.
- NDong C, Danyluk J, Wilson KE, Pocock T, Huner NP y Sarhan F. 2002. Cold-regulated cereal chloroplast late embryogenesis abundant-like proteins. Molecular characterization and functional analyses. *Plant Physiol.* 129: 1368-1381.
- Neale AD, Wahleithner JA, Lund M, Bonnett HT, Kelly A, Meeks-Wagner DR, Peacock WJ y Dennis ES. 1990. Chitinase, β -1,3-Glucanase, Osmotin, and Extensin Are Expressed in Tobacco Explants during Flower Formation. *Plant Cell* 2: 673-684.
- Neer EJ, Schmidt CJ, Nambudripad R y Smith TF. 1994. The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature* 371 :297-300.
- Negbi M. 1990. Physiological research on the saffron crocus (*Crocus sativus*). En F. Tamaro y L. Marra (1990) pp 183-207.
- Negbi M. 1999. Saffron Cultivation: Past, Present and Future Prospects. En *Saffron: Crocus sativus L* Ed. Harwood Academic Publishers, Singapore.
- Niebel A, De Almeida Engler J, Tire C, Engler G, Van Montagu M y Gheysen G. 1993. Induction Patterns of an Extensin Gene in Tobacco upon Nematode Infection. *Plant Cell* 5: 1697-1710.
- Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S y von Heijne G. 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.* 10: 1-6.
- Nitti G, Orru S, Bloch Jr. C, Morhy L, Marino G y Pucci P. 1995. Amino acid sequence and disulphide-bridge pattern of three gamma- thionins from *Sorghum bicolor*. *Eur. J. Biochem.* 228: 250-256.

- Nuez F, Carrillo JM y Lozano R. 2002. Genómica y Mejora Vegetal. Ed. Junta de Andalucía, Sevilla y Mundi-Prensa, Madrid.
- Oda Y y Tatsumi Y. 1993. New lectins from bulbs of *Crocus sativum*. *Biol. Pharm. Bull.* 16: 978-981.
- Ohlrogge J. y Benning G. 2000. Unraveling plant metabolism by EST analysis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 224-228.
- Orsel M, Filleur S, Fraissier V y Daniel-Vedele F. 2002. Nitrate transport in plants: which gene and which control? *J. Exp. Bot.* 53: 825-833.
- Oztur ZN, Talame V, Deyholos M, Michalowski CB, Galbraith DW, Gozukirmizi N, Tuberosa R y Bohnert HJ. 2002. Monitoring large-scale changes in transcript abundance in drought- and salt-stressed barley. *Plant Mol. Biol.* 48: 551-573.
- Paris N, Rogers SW, Jiang L, Kirsch T, Beevers L, Phillips TE y Rogers JC. 1997. Molecular Cloning and Further Characterization of a Probable Plant Vacuolar Sorting Receptor. *Plant Physiol.* 115: 29-39.
- Park YS, Kwak JM, Kwon OY, Kim YS, Lee DS, Cho MJ, Lee HH y Nam HG. 1993. Generation of expressed sequence tags of random root cDNA clones of *Brassica napus* by single-run partial sequencing. *Plant Physiol.* 103: 359-370.
- Paschal BM, Fritze C, Guan T y Gerace L. 1997. High Levels of the GTPase Ran/TC4 Relieve the Requirement for Nuclear Protein Transport Factor 2. *J. Biol. Chem.* 272: 21534-21539.
- Pay A, Heberle-Bors E y Hirt H. 1992. An alfalfa cDNA encodes a protein with homology with translationally controlled human tumor protein. *Plant Mol. Biol.* 19: 501-503.
- Peitsch MC. 1995. ProMod and Swiss-Model: Internet-based tools for automated comparative protein modelling. *Biochem. Soc. Trans.* 24: 274-279.

- Peitsch MC. 1996. Protein modelling by E-mail. *Bio/Technology* 13: 658-660.
- Pérez Bueno M. 1988. El azafrán. Ed. Mundi-Prensa. Madrid.
- Peumans WJ, Proost P, Swennwn RL y Van Damme EJ. 2002. The abundant class III chitinase homolog in young developing banana fruits behaves as a transient vegetative storage protein and most probably serves as an important supply of amino acids for the synthesis of ripening-associated proteins. *Plant Physiol.* 130: 1063-1072.
- Piqueras A, Han BH, Escribano J, Rubio C, Hellín E y Fernández JA. 1999. Development of cormogenic nodules and microcorms by tissue culture, a new tool for the multiplication and genetic improvement of saffron. *Agronomie* 19: 603-610.
- Plessner O, Ziv M y Negbi M. 1990. In vitro corm production in the saffron crocus (*Crocus sativus* L.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 20: 89-94.
- Powell AL, van Kan J, ten Have A, Visser J, Greve LC, Bennett AB y Labavitch JM. 2000. Transgenic expression of pear PGIP in tomato limits fungal colonization. *Mol. Plant Microbe Interact* 13: 942-950.
- Puig A, Primm TP, Surendran R, Lee JC, Ballard KD, Orkiszewski RS, Makarov V y Gilbert HF. 1997. A 21-kDa C-terminal Fragment of Protein-disulfide Isomerase has Isomerase, Chaperone, and Anti-chaperone Activities. *J. Biol. Chem.* 272: 32988-32994.
- Pysh LD, Wysocka-Diller JW, Camilleri C, Bouchez D y Benfey PN. 1999. The GRAS gene family in *Arabidopsis*: sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes. *Plant J.* 18: 111-119.

- Ramachandran S, Christensen HE, Ishimaru Y, Dong CH, Chao-Ming W, Cleary AL y Chua NH. 2000. Profilin plays a role in cell elongation, cell shape maintenance, and flowering in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 124: 1637-1647.
- Ranocha P, Chabannes M, Chamayou S, Danoun S, Jauneau A, Roudet AM y Goffner D. 2002. Laccase down-regulation causes alterations in phenolic metabolism and cell wall structure in poplar. *Plant Physiol.* 129: 145-155.
- Reddy AS, Day IS, Narasimhulu SB, Safadi F, Reddy VS, Golovkin M y Harnly MJ. 2002. Isolation and characterization of a novel calmodulin-binding protein from potato. *J. Biol. Chem.* 277: 4206-4214.
- Richardson A, Duncan J y McDougall GJ. 2000. Oxidase activity in lignifying xylem of a taxonomically diverse range of trees: identification of a conifer laccase. *Tree Physiol.* 20: 1039-1047.
- Riedl JL y Walker-Simmons MK. 1993. Group 3 Late Embryogenesis Abundant Proteins in Desiccation-Tolerant Seedlings of Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiol.* 102: 125-131.
- Roby D, Broglie K, Cressman R, Biddle P, Chet IL y Broglie R. 1990. Activation of a Bean Chitinase Promoter in Transgenic Tobacco Plants by Phytopathogenic Fungi. *Plant Cell* 2: 999-1007.
- Roe JL, Nemhauser JL y Zambryski PC. 1997. TOUSLED participates in apical tissue formation during gynoecium development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 9: 335-353.
- Rolland F, Moore B y Sheen J. 2002. Sugar Sensing and Signaling in Plants. *Plant Cell* supplement 2002: S185-S205.
- Römisch K. 1999. Surfing the Sec61 channel: bi-directional protein translocation across the ER membrane. *J. Cell Sci.* 112: 4185-4191.

- Ruan YL, Chourey PS, Delmer DP y Pérez-Grau. 1997. The Differential Expression of Sucrose Synthase in Relation to Diverse Patterns of Carbon Partitioning in Developing Cotton Seed. *Plant Physiol.* 115: 375-385.
- Saftner RA y Baldi BG. 1990. Polyamine levels and tomato fruit development: Possible interactions with ethylene. *Plant Physiol.* 92: 547.
- Salomi MJ, Nair SC y Panikkar KR. 1991. Inhibitory Effects of *Nigella sativa* and Saffron (*Crocus sativus*) on Chemical Carcinogenesis in Mice. *Nutrition and Cancer* 1:67-72.
- Samac DA y Shah DM. 1991. Developmental and Pathogen-Induced Activation of the *Arabidopsis* Acidic Chitinase Promoter. *Plant Cell* 3: 1063:1072.
- Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T. 1989. Molecular Clonig. A Laboratory Manual. 2ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sambrook J y Russell DW. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanchez JC, Schaller D, Ravier F, Golaz O, Jaccoud S, Belet M, Wilkins MR, James R, Deshusses J y Hochstrasser D. 1997. Translationally controlled tumor protein: a protein identified in several nontumoral cells including erythrocytes. *Electrophoresis* 18: 150-155.
- Sanderfoot AA y Raikhel NV. 1999. The Specificity of Vesicle Trafficking: Coat Proteins and SNAREs. *Plant Cell* 11: 629-641.
- Sanders D y Bethke P. 2000. Membrane Transport. En *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Ed. Bob B. Buchanan, Wilhelm Gruissem y Russell L. Jones. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland.

- Sassa N, Matsushita Y, Nakamura T y Nyunoya H. 2001. The molecular characterization and in situ expression pattern of pea SCARECROW gene. *Plant Cell Physiol.* 42: 385-394.
- Segura A, Moreno M, Madueno F, Molina A y García-Olmedo F. 1999. Snakin-1, a peptide from potato that is active against plant pathogens. *Mol. Plant Microbe Interact* 12: 16-23.
- Shafqat J, El-Ahmad M, Danielsson O, Martínez MC, Persson B, Parés X y Jörnvall H. 1996. Pea formaldehyde-active class III alcohol dehydrogenase: Common derivation of the plant and animal forms but not of the corresponding ethanol-active forms (classes I and P). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 5595-5599.
- Shannon JC, Pien FM y Liu KC. 1996. Nucleotides and Nucleotides Sugar in Developing Maize Endosperms. *Plant Physiol.* 110: 835-843.
- Siegfried KR, Eshed Y, Baum SF, Ostuga D, Drews GN y Bowman JL. 1999. Members of the YABBY gene family specify abaxial cell fate in *Arabidopsis*. *Development* 126: 4117-4128.
- Silljé HHW, Takahashi K, Tanaka K, Van Houwe G y Nigg EA. 1999. Mammalian homologues of the plant *Tousled* gene code for cell-cycle-regulated kinases with maximal activities linked to ongoing DNA replication. *EMBO J.* 18: 5691-5702.
- Simpson GG, Clark GP, Rothnie HM, Boelens W, van Venrooij W y Brown JW. 1995. Molecular characterization of the spliceosomal proteins U1A and U2B'' from higher plants. *EMBO J.* 14: 4540-4550.
- Smeets K, Van Damme EJM y Peumans WJ. 1994. Comparative study of the post translational processing of the mannose-binding lectins in the bulbs of garlic (*Allium sativum* L.) and ramsons (*Allium ursinum* L.). *Glycoconj. J.* 11: 309-320.

- Smith TF, Gaitatzes C, Saxena K y Neer EJ. 1999. The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends. Biochem. Sci.* 24: 181-185.
- Sokolenko A, Lerbs-Mache S, Altschmied L y Herrmann RG. 1998. Clp protease complexes and their diversity in chloroplasts. *Planta* 207: 286-295.
- Somerville C y Somerville S. 1999. Plant Functional Genomics. *Science* 285: 380-383.
- Spremulli L. 2000. Protein Synthesis, Assembly, and Degradation. En *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Ed. Bob B. Buchanan, Wilhelm Gruissem y Russell L. Jones. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland.
- Sterky F, Regan S, Karlsson J, Hertzberg M, Rohde A, Holmberg A, Amini B, Bhalerao R, Larsson M, Villarroel R, Van Montagu M, Sandberg G, Olsson O, Teeri TT, Boerjan W, Gustafsson P, Uhlén M, Sundberg B y Lundeberg J. 1998. Gene discovery in the wood-forming tissues of poplar: Analysis of 5,692 expressed sequence tags. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 13330-13335.
- Stuart-Rogers C y Flavell AJ. 2001. The Evolution of Ty1-copia Group Retrotransposons in Gymnosperms. *Mol. Biol. Evol.* 18: 155-163.
- Sturaro M, Linnestad C, Kleinhofs A, Olsen OA y Doan DNP. 1998. Characterization of a cDNA encoding a putative extensin from developing barley grains (*Hordeum vulgare* L.). *J. Exp. Bot.* 49: 1935-1944.
- Suh MC, Choi D y Liu JR. 1998. Cadmium resistance in transgenic tobacco plants expressing the *Nicotiana glutinosa* L. metallothionein-like gene. *Mol. Cells* 8: 678-684.

- Sung DY, Kaplan F y Guy CL. 2001. Plant Hsp70 molecular chaperones: Protein structure, gene family, expression and function. *Physiol. Plant* 113: 443-451.
- Sutton MW y Wale SJ. 1985. The control of *Penicillium corymbiferum* on *Crocus* and its effect on corm production. *Plant Pathology* 34: 566-570.
- Swoboda I, Bhalla PL, Xu H, Zhang Y, Mittermann I, Valenta R y Singh MB. 2001. Identification of prnp1, a tobacco profilin gene activated in tip-growing cells. *Plant Mol. Biol.* 46: 531-538.
- Takeda S, Sugimoto K, Otsuki H y Hirochika H. 1998. Transcriptional activation of the tobacco retrotransposon Tto1 by wounding and methyl jasmonate. *Plant Mol. Biol.* 136: 365-376.
- Tanaka H, Onouchi H, Kondo M, Hara-Nishimura I, Nishimura M, Machida C y Machida Y. 2001. A subtilisin-like serine protease is required for epidermal surface formation in *Arabidopsis* embryos and juvenile plants. *Development* 128: 4681-4689.
- Tarantillis PA, Morjani H, Polissiou M y Manfait M. 1994. Inhibition of Growth and Induction of Differentiation of Promyelocytic Leukemia (HL-60) by Carotenoids from *Crocus sativus* L. *Anticancer Research* 14: 1913-1918.
- Terol J, Castillo MC, Bargues M, Pérez-Alonso M y de Frutos R. 2001. Structural and Evolutionary Analysis of the *copia*-like Elements in the *Arabidopsis thaliana* Genome. *Mol. Biol. Evol.* 18: 882-892.
- *The Arabidopsis Genome Initiative*. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815.
- Thevissen K, Ghazi A, De Samblanx GW, Brownlee C, Osborn RW y Broekaert WF. 1996. Fungal Membrane Responses Induced by Plant Defensins and Thionins. *J. Biol. Chem.* 271: 15018-15025.

- Thiele H, Berger M, Skälweit A y Thiele BJ. 2000. Expression of the gene and processed pseudogenes encoding the human and rabbit translationally controlled tumour protein (TCTP). *Eur. J. Biochem.* 267: 5473-5481.
- To KY, Suen DF y Grace Chen SC. 1999. A Sweet Potato Leaf cDNA (AF130978) Encoding Barley and Rice B12D Homologue. (PGR99-092). *Plant Physiol.* 120: 933.
- Tocaven S. 2003. Le cormus du safran, *Crocus sativus* L.: physiologie, chimie et utilisations diverses. *Thèse pour l'obtention du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie*. Université Bordeaux 2- Victor Segalen. U.F.R. des Sciences Pharmaceutiques.
- Trewavas A. 2000. Signal Perception and Transduction. En *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Ed. Bob B. Buchanan, Wilhelm Gruissem y Russell L. Jones. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland.
- Ujino-Ihara T, Yoshimura K, Ugawa Y, Yoshimaru H, Nagasaka K y Tsumura Y. 2000. Expression analysis of ESTs derived from the inner bark of *Cryptomeria japonica*. *Plant Mol. Biol.* 43: 451-457.
- Van Damme EJM, Smeets K, Torrekens S, Van Leuven F y Peumans WJ. 1993. The mannose-specific lectins from ramsons (*Allium ursinum* L.) are encoded by three sets of genes. *Eur. J. Biochem.* 217: 123-129.
- Van Damme EJM, Astoul CH, Barre A, Rougé P y Peumans WJ. 2000. Cloning and characterization of a monocot mannose-binding lectin from *Crocus vernus*. *Eur. J. Biochem.* 267: 5067-6077.
- Van der Voorn L y Ploegh HL. 1992. The WD-40 repeat. *FEBS Lett.* 307 :131-134.

- Vicient CM, Jääskeläinen MJ, Kalendar R y Schulman AH. 2001. Active Retrotransposons Are a Common Feature of Grass Genomes. *Plant Physiol.* 125: 1283-1292.
- Vicient CM, Suoniemi A, Ananthawat-Jónsson K, Tanskanen J, Beharav A, Nevo E y Schulman AH. 1999. Retrotransposon *BARE-1* and Its Role in Genome Evolution in the Genus *Hordeum*. *The Plant Cell* 11: 1769-1784.
- Vitale A y Denecke J. 1999. The Endoplasmic Reticulum-Gateway of the Secretory Pathway. *Plant Cell* 11, 615-628.
- Voytas DF y Ausubel FM. 1988. A *copia*-like transposable element family in *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 336: 242-244.
- Voytas DF, Cummings MP, Konieczny A, Ausubel FM y Roderick SR. 1992. *Copia*-like elements are ubiquitous among plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 7124-7128.
- Wang S, Liu N, Peng K y Zhang Q. 1999. The distribution and copy number of *copia*-like retrotransposons in rice (*Oryza sativa*) and their implications in the organization and evolution of the rice genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 6824-6828.
- Wang H y Ng TB. 2002. Isolation of an antifungal thaumatin-like protein from kiwi fruits. *Phytochemistry* 61: 1-6.
- Wang F, Sanz A, Brenner ML y Smith A. 1993. Sucrose Synthase, Starch Accumulation, and Tomato Fruit Sink Strength. *Plant Physiol.* 101: 321-327.
- Wen F, Zhu Y y Hawes MC. 1999. Effect of Pectin Methyltransferase Gene Expression on Pea Root Development. *Plant Cell* 11: 1129-1140.
- Wendel JF y Wessler SR. 2000. Retrotransposon-mediated genome evolution on a local ecological scale. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 6250-6252.

- Wessler SR. 1996. Turned on by stress. Plant retrotransposons. *Curr. Biol.* 6:959-961.
- Wessler SR. 2001. Plant Transposable Elements. A Hard Act to Follow. *Plant Physiol.* 125: 149-151.
- Whetten R, Sun YH, Zhang Y y Sederoff R. 2001. Functional genomics and cell wall biosynthesis in loblolly pine. *Plant Mol. Biol.* 47: 275-291.
- White JA, Todd J, Newman T, Focks N, Girke T, Martínez de Ilárduya O, Jaworski JG, Ohlrogge JB y Benning C. 2000. A New Set of *Arabidopsis* Expressed Sequence Tags from Developing Seeds. The Metabolic Pathway from Carbohydrates to Seed Oil. *Plant Physiol* 124: 1582-1594.
- White SA, Habera LF y Wessler SR. 1994. Retrotransposons in the flanking regions of normal plant genes: A role for *copia*-like elements in the evolution of gene structure and expresión. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 11792-11796.
- Wilkins TA, Bednarek SY y Raikhel NV. 1991. Role of Propeptide Glycan in Post-Translational Processing and Transport of Barley Lectin to Vacuoles in Transgenic Tobacco. *Plant Cell* 2: 301-313.
- Wilkins TA y Raikhel NV. 1989. Expression of Rice Lectin Is Governed by Two Temporally and Spatially Regulated mRNAs in Developing Embryos. *Plant Cell* 1: 541-549.
- Wingler A, Fritzius T, Wiemken A, Boller T y Aeschbacher RA. 2000. Trehalose Induces the ADP-Glucose Pyrophosphorylase Gene, *ApL3*, and Starch Synthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 124: 105-114.
- Wisniewski JP, Cornille P, Agnel JP y Montillet JL. 1999. The extensin multigene family responds differentially to superoxide or hydrogen peroxide in tomato cell cultures. *FEBS Lett.* 447: 264-268.

- Wyles JP, McMaster CR y Ridgway ND. 2002. Vesicle-associated Membrane Protein-associated Protein-A (VAP-A) Interacts with the Oxysterol-binding Protein to Modify Export from the Endoplasmic Reticulum. *J. Biol. Chem.* 277: 29908-29918.
- Wysocka-Diller JW, Helariutta Y, Fukaki H, Malamy JE y Benfey PN. 2000. Molecular analysis of SCARECROW function reveals a radial patterning mechanism common to root and shoot. *Development* 127: 595-603.
- Xu D, Duan X, Wang B, Hong B, Ho T y Wu R. 1996. Expression of a Late Embryogenesis Abundant Protein Gene, HVA1, from Barley Confers Tolerance to Water Deficit and Salt Stress in Transgenic Rice. *Plant Physiol.* 110: 249-257.
- Xu Y, Liu Y, Ridgway ND y McMaster CR. 2001. Novel Members of the Human Oxysterol-binding Protein Family Bind Phospholipids and Regulate Vesicle Transport. *J. Biol. Chem.* 276: 18407-18414.
- Yamamoto K, Ishida C, Saito M, Konami Y, Osawa T y Irimura T. 1994. Cloning and sequence analysis of the *Mackia amurensis* haemagglutinin cDNA. *Glycoconj. J.* 11: 572-575.
- Yang H y Czapla TH. 1993. Isolation and Characterization of cDNA Clones Encoding Jacalin Isolectins. *J. Biol. Chem.* 268: 5905-5910.
- Yao C, Conway WS, Ren R, Smith D, Ross GS y Sams CE. 1999. Gene encoding polygalacturonase inhibitor in apple fruit is developmentally regulated and activated by wounding and fungal infection. *Plant Mol. Biol.* 39: 1231-1241.
- Yarm FR. 2002. Plk phosphorylation regulates the microtubule-stabilizing protein TCTP. *Mol. Cell. Biol.* 22: 6209-6221.
- Yeh S, Moffatt BA, Griffith M, Xiong F, Yang DSC, Wiseman SB, Sarhan F, Danyluk J, Xue YQ, Hew CL, Doherty-Kirby A y Lajoie

- G. 2000. Chitinase Genes Responsive to Cold Encode Antifreeze Proteins in Winter Cereals. *Plant Physiol.* 124: 1251-1263.
- Yoshiba Y, Aoki C, Iuchi S, Nanjo T, Seki M, Sekiguchi F, Yamaguchi-Shinozaki K y Shinozaki K. 2001. Characterization of four extensin genes in *Arabidopsis thaliana* by differential gene expression under stress and non-stress conditions. *DNA Res* 8: 115-122.
 - Zareie R, Melanson DL y Murphy PJ. 2002. Isolation of fungal cell wall degrading proteins from barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves infected with *Rhynchosporium secalis*. *Mol. Plant Microbe Interact* 15: 1031-1039.
 - Zegzouti H, Jones B, Frasse P, Marty C, Maitre B, Latch A, Pech JC y Bouzayen M. 1999. Ethylene-regulated gene expression in tomato fruit: characterization of novel ethylene-responsive and ripening-related genes isolated by differential display. *Plant J.* 18: 589-600.
 - Zheng H, Fischer von Mollard G, Kovaleva V, Stevens TH y Raikhel NV. 1999. The Plant Vesicle-associated SNARE AtVTI1a Likely Mediates Vesicle Transport from the *Trans*-Golgi Network to the Prevacuolar Compartment. *Mol. Biol. Cell* 10: 2251-2264.
 - Zheng B, Halperin T, Hruskova-Heidingsfeldova O, Adam Z, Clarke AK. 2002. Characterization of Chloroplast Clp proteins in *Arabidopsis*: Localization, tissue specificity and stress responses. *Physiol. Plant* 114: 92-101.
 - Zhong R, Kays SJ, Schroeder BP y Ye ZH. 2002. Mutation of a Chitinase-Like Gene Causes Ectopic Deposition of Lignin, Aberrant Cell Shapes, and Overproduction of Ethylene. *Plant Cell* 14: 165-179.
 - Zrenner R, Salanoubat M, Willmitzer L y Sonnewald U. 1995. Evidence of the crucial role of sucrose synthase for sink strength

using transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.). *Plant J.* 7: 97-107.

